

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL**



**TESIS DOCTORAL**

**Caracterización genómica y resistencia a antimicrobianos de**  
***Campylobacter***

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Diego Flórez Cuadrado**

DIRECTORES

**Lucas Domínguez Rodríguez**  
**María Concepción Porrero Calonge**  
**Alberto Quesada Molina**

**Madrid, 2018**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE VETERINARIA  
Departamento de Sanidad Animal

CENTRO DE VIGILANCIA SANITARIA VETERINARIA (VISAVET)

Servicio de Zoonosis de Transmisión Alimentaria y Resistencia a  
Antimicrobianos

TESIS DOCTORAL

**Caracterización genómica y resistencia a  
antimicrobianos de *Campylobacter***

Memoria para optar al grado de Doctor con Mención  
Internacional presentada por

**Diego Flórez Cuadrado**

Bajo la dirección de los doctores: Lucas Domínguez Rodríguez, M<sup>a</sup>  
Concepción Porrero Calonge y Alberto Quesada Molina

**Madrid, 2017**



Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Veterinaria  
Departamento de Sanidad Animal

Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET)

Servicio de Zoonosis de Transmisión Alimentaria y Resistencia a  
Antimicrobianos



Tesis Doctoral

**Caracterización genómica y resistencia a  
antimicrobianos de *Campylobacter***

Memoria para optar al grado de Doctor presentada por

**Diego Flórez Cuadrado**

Directores de la Tesis Doctoral: Lucas Domínguez Rodríguez, M<sup>a</sup>  
Concepción Porrero Calonge y Alberto Quesada Molina

Madrid, 2017





Universidad Complutense de Madrid  
Facultad de Veterinaria  
Departamento de Sanidad Animal

D. Lucas Domínguez Rodríguez, Catedrático del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid; D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> Concepción Porrero Calonge, Doctora en Ciencias Veterinarias por la Universidad Complutense de Madrid; y D. Alberto Quesada Molina, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura,

**CERTIFICAN**

Que la tesis doctoral que lleva por título “Caracterización genómica y resistencia a antimicrobianos de *Campylobacter*” ha sido realizada por el licenciado en Biología D. Diego Flórez Cuadrado en el Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET) de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección conjunta de los que suscriben, y estimamos que reúne los requisitos exigidos para optar al título de Doctor con Mención Internacional por la Universidad Complutense de Madrid.

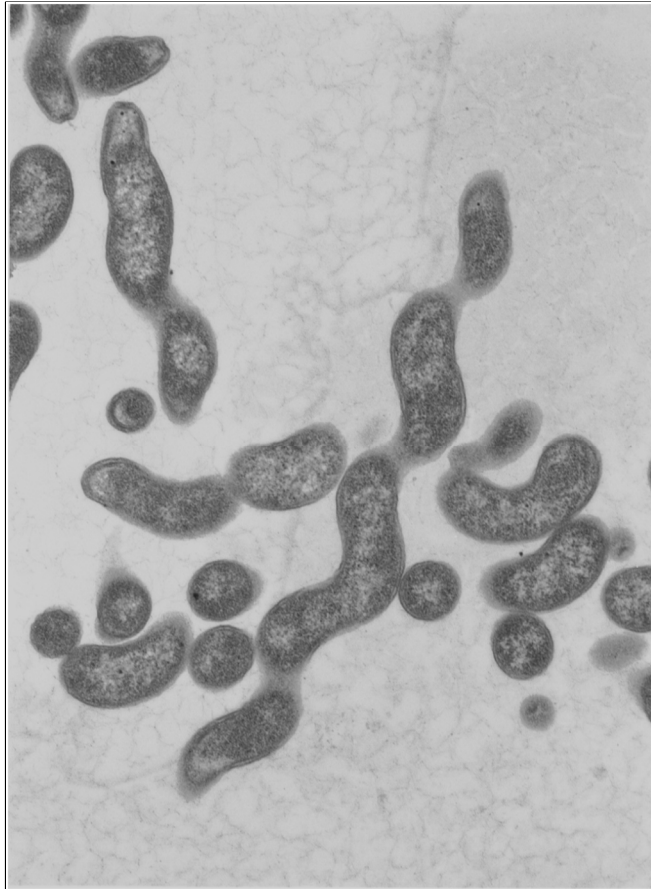
Madrid, 2017

Fdo. Lucas Domínguez  
Rodríguez

Fdo. M<sup>a</sup> Concepción  
Porrero Calonge

Fdo. Alberto Quesada  
Molina





Planos transversales y longitudinales de *Campylobacter jejuni*.  
Microscopio electrónico de transmisión (MET).

**Imagen cortesía de D<sup>a</sup>. Mary Parker.**

Instituto de Investigación Alimentaria, Norwich, Reino Unido

***Image courtesy of Ms Mary Parker.***

*Institute of Food Research, Norwich, UK*





## Proyectos, contratos y becas de investigación

El trabajo de tesis doctoral que se presenta a continuación se ha realizado en el marco de los siguientes proyectos, contratos y becas de investigación:

- Beca de Formación del Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Economía y Competitividad. Referencia de la ayuda BES-2013-064701.
- Beca de movilidad predoctoral para la realización de estancias breves en centros de I+D. Ministerio de Economía y Competitividad. Referencias de las ayudas: EEBB-I-15-10321, EEBB-I-16-11366 y EEBB-I-17-12173.
- Proyectos del Ministerio de Economía y Competitividad:
  - MALDI TOF *Campylobacter*: genotipado y caracterización molecular. Referencia del proyecto AGL2012-39028.
  - *Campylobacter*: detección y caracterización molecular. Análisis genotípico de virulencia y posibles estrategias para su control. Referencia del proyecto AGL2009-07550.
- Contrato del Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. Referencia de la ayuda 2014/000223.
- Programa de actividades de I+D entre grupos de investigación de la Comunidad de Madrid: Tecnologías Avanzadas en Vigilancia Sanitaria. Referencia del programa S2013/ABI-2747



*Al profesor Benjamín Manzanal*  
*A mi padre, a mi madre y a mi madrina*



## AGRADECIMIENTOS

Un día te sorprendes escribiendo los agradecimientos de la tesis. En este punto pienso en cómo era yo el primer día que entré en este laboratorio, lleno de ilusiones pero muy pobre en experiencia. Comparo quien era entonces con la persona que soy ahora y podría decir que el doctorado ha sido una escultura de mí mismo. Me he encontrado con varios artistas durante este tiempo; unos esculpieron, otros limaron, otros lijaron y otros pulieron. El resultado es lo que soy ahora.

Me gustaría basarme en los objetivos generales que se siguen en la formación de escultores de la Facultad de Bellas Artes de esta universidad, para dar las gracias a todas esas personas que formaron parte de este proyecto.

Gracias a mis directores Lucas, Concha y Alberto, artistas del martillo y el cincel. Gracias por haberme ayudado a desarrollar mi capacidad de percepción y autocrítica, por darme la capacidad de suprimir las barreras entre la conceptualización de un estudio y su materialización, en definitiva por darme la capacidad de materializar la obra. Gracias por vuestro tiempo y generosidad, habéis dado forma a la piedra y ese trabajo requiere paciencia, planificación y una constante verificación.

Gracias a las personas que hicieron posibles mis estancias en Reino Unido: Samuel K. Sheppard, Guillaume Meric, Ben Pascoe, Daniel Falush y Ana Vidal. Gracias por potenciar mi capacidad reflexiva y analítica. Gracias a todas las personas que me hicieron sentir como si estuviera en casa: Víctor, Ángela, Ferrán, Waldo, Francesca, Guillermito, Gift, Amandine, Leo, Jesús, Marcelo, Jess, Diana y Evangelos. Habéis limado la piedra, alisado las marcas dejadas por el cincel y perfeccionado la forma final de la obra.

Gracias a todo el personal de VISAVET, especialmente al servicio de ZTA: María Ugarte, María García, Fany, Nis, Irene, Celia, Estefanía, Esther, Silvia y Pedro. Gracias por darme conocimientos técnicos y herramientas propias de la configuración de cada estudio, por fomentar el trabajo colaborativo y por vuestro respeto. Habéis lijado el producto final, eliminado las marcas de cincel y rayones haciendo que la piedra luzca más profesional.

Gracias a Emmanouil, Adriana, Paola, Carmiña, Felipe, Celia, Bolu, Otilia, Teresa, Iván, Montse y Aitor. Gracias por familiarizarme con aspectos de la obra artística que intervienen decisivamente en la escultura. Vosotros sois quienes me habéis hecho sentir una auténtica obra de arte. Gracias por vuestro cariño, comprensión y lealtad.

Gracias al profesor Benjamín Manzanal. Gracias por haberme enseñado a analizar e interpretar las formas extraídas de la naturaleza y así aprender a sintetizar. Gracias por haber visto en una piedra una futura escultura. Nos deslumbraste con tu amor por la microbiología y algunos hemos hecho de tus clases un estilo de vida.

Gracias a Covadonga, Federico, Jaime, Rencor, Julia, Diego y Salvador. Gracias por permitirme adquirir un mayor conocimiento de obras y artistas que permitan desarrollar mi trabajo en el espacio tridimensional y conceptual. Artistas y referentes fuera del laboratorio.

Gracias a mi familia, especialmente a mis padres. Gracias por enseñarme hábitos de trabajo y actitudes para el desarrollo personal, por potenciar mi estilo propio, y por permitirme expresarme con libertad. Gracias por quererme tanto y tan bien.

MUCHAS GRACIAS A TODOS

# ÍNDICE





|   |     |
|---|-----|
| <b>1. RESUMEN</b>   | 20  |
| <b>2. SUMMARY</b>   | 24  |
| <b>3. INTRODUCCIÓN</b>  | 28  |
| 3.1 <i>Campylobacter</i>  | 30  |
| 3.1.1 Antecedentes históricos   | 30  |
| 3.1.2 Características generales   | 31  |
| 3.1.3 Genoma  | 32  |
| 3.1.4 Metabolismo   | 34  |
| 3.2 Epidemiología   | 35  |
| 3.2.1 Caracterización   | 36  |
| 3.2.2 Estructura poblacional  | 37  |
| 3.2.3 Principales hospedadores  | 40  |
| 3.3 Aspectos clínicos de la infección en personas   | 41  |
| 3.4 Resistencia a antimicrobianos   | 42  |
| 3.4.1 Quinolonas  | 44  |
| 3.4.2 Tetraciclinas   | 45  |
| 3.4.3 Macrólidos  | 45  |
| 3.4.4 Aminoglucósidos   | 47  |
| 3.4.5 Islas genómicas de multirresistencia  | 49  |
| <b>4. OBJETIVOS</b>   | 52  |
| 4.1 Objetivo I: Estudio de la diversidad genética de <i>C. jejuni</i> .   | 54  |
| 4.2 Objetivo II: Detección del gen de resistencia a eritromicina <i>erm(B)</i> en <i>Campylobacter</i> aislados de animales de abasto y aguas residuales.   | 54  |
| 4.3 Objetivo III: Caracterización genómica y genes de resistencia a antimicrobianos en <i>Campylobacter</i> aislados de personas, animales de abasto y aguas residuales.  | 55  |
| <b>5. OBJECTIVES</b>  | 56  |
| 5.1 Objective I: Study of the genetic diversity of <i>C. jejuni</i> .   | 58  |
| 5.2 Objective II: Detection of the erythromycin resistance gene <i>erm(B)</i> in <i>Campylobacter</i> isolates from food animals and wastewater.  | 58  |
| 5.3 Objective III: Genomic characterization and antimicrobial resistance genes in <i>Campylobacter</i> isolates from humans, food animals and wastewater.   | 59  |
| <b>6. TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN</b>   | 60  |
| 6.1 Polimorfismo genómico, genes de virulencia y perfiles metabólicos de <i>Campylobacter jejuni</i> ST-45 aislados de pollos.  | 62  |
| 6.2 Primera descripción del gen <i>erm(B)</i> en un <i>Campylobacter coli</i> de Europa.  | 75  |
| 6.3 Resistencia a eritromicina en <i>Campylobacter</i> aislados de pavos: presencia del gen <i>erm(B)</i> e identificación de posibles especies bacterianas involucradas en la transmisión horizontal de este mecanismo de resistencia. | 83  |
| 6.4 Caracterización genómica y resistoma de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> aislados de personas, animales y aguas residuales.  | 105 |
| <b>7. DISCUSIÓN</b>   | 138 |
| 7.1 Diversidad genética de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> .  | 140 |
| 7.2 Resistencia a macrólidos de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> .   | 143 |
| 7.3 Genes de resistencia a antimicrobianos en <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> .   | 148 |
| <b>8. CONCLUSIONES</b>  | 154 |
| <b>9. CONCLUSIONS</b>   | 158 |
| <b>10. BIBLIOGRAFIA</b>   | 162 |
| <b>11. ANEXOS</b>   | 192 |
| 11.1 Abreviaturas   | 194 |
| 11.2 Lista de genes   | 195 |
| 11.3 Estancias internacionales  | 198 |
| 11.4 Artículos científicos y de divulgación   | 199 |



# 1.RESUMEN



Las bacterias del género *Campylobacter* son las principales causantes de gastroenteritis de origen alimentario en todo el mundo, principalmente las especies *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*. Estos microorganismos colonizan el tracto digestivo de aves y mamíferos, siendo la principal vía de infección para las personas el consumo de carne de pollo contaminada. La infección producida por *Campylobacter* suele ser auto-limitante, pero ocasionalmente se producen complicaciones que requieren de tratamiento antimicrobiano, frecuentemente con eritromicina.

La resistencia a eritromicina en *Campylobacter* se relaciona con mutaciones en genes o proteínas ribosomales, bombas de eflujo y con la presencia del gen *erm*(B). Este gen había sido identificado exclusivamente en aislados de *Campylobacter* procedentes de China y en todos los casos estaba localizado en islas genómicas de multirresistencia. La presencia de islas genómicas que portan genes de resistencia a diferentes antimicrobianos limita las opciones terapéuticas.

En el presente trabajo de tesis doctoral se ha caracterizado una colección de aislados de *C. jejuni* y *C. coli* procedentes de animales, personas y aguas residuales. La finalidad del estudio fue la caracterización de la población por MLST y la identificación de genes de resistencia a antimicrobianos y su asociación en islas genómicas de multirresistencia. Además, se ha evaluado la presencia de perfiles de genes metabólicos en aislados pertenecientes a secuencias tipo (ST) vinculadas con campilobacteriosis en personas.

En el estudio de perfiles metabólicos se ha visto que el gen  $\gamma$ -glutamyl transpeptidasa (*ggt*), implicado en la expresión del enzima que metaboliza la glutamina, se ha asociado significativamente con *C. jejuni* ST-45. Además se han identificado en aislados de *C. jejuni* ST-45 otros genes implicados en el metabolismo de aminoácidos tales como *ansB*(s), *fucP* y *dmsA*, llegándose a identificar cinco perfiles de potencial metabólico diferente. El análisis de polimorfismo genético pone de manifiesto la asociación entre determinados factores de colonización y el ST, además de evidenciar las diferentes combinaciones (en cuanto a genes metabólicos se refiere) existentes en la colección.

El estudio de los mecanismos de resistencia a macrólidos en *Campylobacter* dio lugar a la primera descripción en Europa del gen *erm*(B), asociado a una isla genómica de multirresistencia. Se ha detectado este mecanismo de resistencia en aislados de pollo y pavo, indicando el análisis genómico una destacada diversidad de estos elementos.

Los resultados sugieren que la presencia del gen *erm*(B) en *Campylobacter* tiene su origen en bacterias grampositivas y los alelos identificados en este estudio han sido previamente identificados en bacterias patógenas procedentes principalmente de personas y ganado porcino de Asia y Europa. La disposición de los diferentes genes de resistencia y las secuencias detectadas apuntan a una gran movilidad de estos elementos genéticos.

Por último, se caracterizaron por MLST, un total de 252 *Campylobacter* aislados de animales de abasto (portadores), personas (casos clínicos) y aguas residuales (pretratamiento), todos ellos obtenidos en España. Se identificaron otros genes de resistencia a antimicrobianos y su posible asociación con islas genómicas de multirresistencia en aislados de *C. jejuni* y *C. coli*. Se identificaron aislados multirresistentes (resistentes a tres o más clases de antimicrobianos) en muestras de animales, personas y aguas residuales. En 18 aislados de *Campylobacter* se identificaron diferentes islas genómicas de multirresistencia, lo que muestra una agrupación de los genes de resistencia a antimicrobianos en una misma secuencia de ADN. Las islas genómicas de multirresistencia se han identificado en aislados procedentes de animales, personas y aguas residuales, sugiriéndose que estas secuencias genéticas son potenciales vehículos de dispersión de genes de resistencia a antimicrobianos.

## 2.SUMMARY





Bacteria of the genus *Campylobacter*, mainly *C. jejuni* and *C. coli*, represent the most frequent cause of gastroenteritis of alimentary origin worldwide. These microorganisms colonize the digestive tract of birds and mammals. The main route of infection for humans is through the consumption of contaminated poultry meat. The infection produced by *Campylobacter* is usually self-limiting but can occasionally produce complications that require antimicrobial treatment. Erythromycin is the main treatment of choice.

Resistance to erythromycin in *Campylobacter* has been related to mutations in genes or ribosomal proteins, efflux pumps and more recently the presence of the *erm*(B) gene. This gene was originally identified in *Campylobacter* isolates from China and in all cases was located in genomic islands of multiresistance. The genomic islands identified in *Campylobacter* carry genes of resistance to different antimicrobials, which limits the therapeutic options.

In the present doctoral thesis, we characterized a collection of *C. jejuni* and *C. coli* isolates from food animals, humans and wastewater, with the aim to characterize them by MLST and identify antibiotic resistance genes and their association with multiresistance genomic islands. In addition, the metabolic profiles of isolates belonging to sequences types (STs) related with human campylobacteriosis were evaluated.

Regarding the polymorphism detected at genomic level, including virulence genes and metabolic profiles, the characterization of isolates showed that the gamma-glutamyltranspeptidase (*ggt*) gene, responsible for the expression of the enzyme that metabolizes glutamine, was significantly associated with ST-45 of *C. jejuni*. In addition, other genes involved in the metabolism of amino acids such as *ansB*(s), *fucP* and *dmsA* were differentially detected in isolates of *C. jejuni* ST-45, revealing the presence of five different metabolic profiles. The analysis of gene polymorphism showed an association between certain factors of colonization and certain STs, besides evidencing the different combinations of metabolic genes.

The study of macrolide resistance mechanisms in *Campylobacter* resulted in the first description in Europe of the *erm*(B) gene, associated with a genomic island of multiresistance in *Campylobacter* isolates. This mechanism of resistance was detected in *C. coli* isolates from broiler and turkey, with the genomic analysis indicating the diversity of these elements. The results suggest that the presence of the *erm*(B) gene in *Campylobacter* has its origin in grampositive bacteria and that the

alleles identified in this study have been previously detected in pathogenic bacteria mainly from pigs and people in Asia and Europe. The arrangement of the different resistance genes and the sequences detected, point out to a wide mobility of these genetic elements.

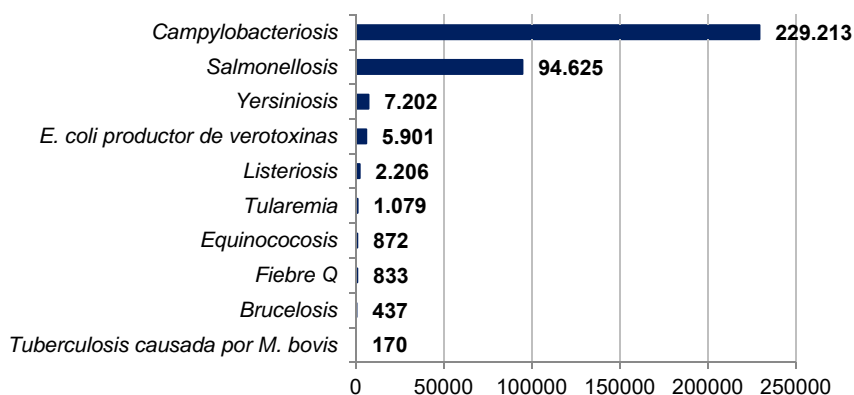
Finally, other antibiotic resistance genes and their possible association with genomic multiresistance islands in *C. jejuni* and *C. coli* isolates were identified. Multiresistant isolates (resistant to three or more classes of antibiotics) were detected in animal, human and wastewater samples. In 18 *Campylobacter* isolates different genomic islands of multiresistance were identified, indicating the clustering of antibiotic resistance genes in the same DNA sequence. This study reveals that these genetic elements from *Campylobacter* are potential dispersion vehicles of antibiotic resistance genes.

## **3.INTRODUCCIÓN**



### 3.1 *Campylobacter*

Una zoonosis, del griego *ζωο-zoo* (animal) y *νοσος-nosos* (enfermedad), se define como cualquier enfermedad que puede transmitirse comúnmente entre animales y personas (1). El género *Campylobacter* es el agente zoonótico que mayor número de gastroenteritis de transmisión alimentaria produce en personas anualmente en la Unión Europea (UE) (2). La infección producida por bacterias del género *Campylobacter* se denomina campilobacteriosis y se debe principalmente a las especies *C. jejuni* (aproximadamente un 90%) y *C. coli* (alrededor del 10%) (3). El último informe de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (*European Food Safety Agency*, EFSA) sobre agentes zoonóticos indica que se han producido 229.213 casos de campilobacteriosis en personas en Europa en el año 2015 (**Figura 1**) (4).



**Figura 1.** Número de casos notificados de zoonosis en personas confirmados en la UE en 2015. Gráfico adaptado de (4).

#### 3.1.1 Antecedentes históricos

La historia del género *Campylobacter* se remonta a finales del siglo XIX. Theodor Escherich observó por primera vez bacterias de *Campylobacter* en 1886 (5), aunque no fue hasta 1913 cuando McFadyean y Stockman lo aislaron de tejido fetal de abortos ovinos (6). La identificación de esta bacteria en abortos de animales continuó siendo descrita y años más tarde se le dio el nombre de *Vibrio fetus* (7).

En la década de los 50 se describen dos nuevas especies de este microorganismo, *Vibrio jejuni* y *Vibrio coli*, aisladas a partir de muestras diarreicas de bovino y porcino respectivamente (5). A pesar de su semejanza morfológica, en 1963 los científicos Sebald y Beron del Instituto Pasteur encontraron que presentaban diferencias bioquímicas con el agente del cólera y separaron el género *Campylobacter* del género *Vibrio* (8). El primer brote de campilobacteriosis descrito en personas se produce en 1942 en presos del centro penitenciario de Illinois por consumo de leche contaminada (9). En la década de los 70, *Campylobacter* fue reconocido oficialmente como patógeno entérico para el hombre describiéndose casos por todo el mundo (5).

### 3.1.2 Características generales

El género *Campylobacter* junto con los géneros *Arcobacter*, *Sulfurospirillum* y *Thioturbo* forman la familia *Campylobacteraceae*, perteneciente al orden *Campylobacterales*, clase *Epsilonproteobacteria* (10). Dentro de *Campylobacter*, del griego *καμπυλη-kampylos* (curva) y *βακτρον-baktron* (bastón), se incluyen microorganismos gramnegativos, no formadores de esporas y de pequeño tamaño (0,2-0,8  $\mu\text{m}$  de grosor y 0,5-5  $\mu\text{m}$  de longitud). Son bacterias móviles debido a la presencia de uno (monotrico) o dos flagelos polares (anfítricos) (**Figura 2**) y la motilidad de la bacteria se produce a modo de sacacorchos o tirabuzón. Generalmente son oxidasa positivos, con excepción de *Campylobacter gracilis* (11). Cuando interaccionan dos o más bacterias adquieren la forma de “S” o “V” y a altas concentraciones de oxígeno puede adquirir forma cocoide o entrar en estado de células viables no cultivables (12).

La temperatura óptima de crecimiento de las especies de *Campylobacter* oscila entre 37 y 42°C. Existen actualmente 36 especies ([www.bacterio.net](http://www.bacterio.net)), de las cuáles *C. jejuni*, *C. coli*, *Campylobacter lari* y *Campylobacter upsaliensis* son las conocidas como especies termófilas debido a que su temperatura de crecimiento óptima son 42°C. Además, las especies termófilas son las que más se asocian con casos de infecciones en personas (*C. jejuni* y en menor medida *C. coli*) (11).

Las bacterias del género *Campylobacter* requieren una atmósfera microaerófila (85%  $\text{N}_2$ , 3-5%  $\text{CO}_2$  y 5-10%  $\text{O}_2$ ), aunque la tolerancia al oxígeno puede variar de unas especies a otras (11). A pesar de las características de crecimiento y su reducida habilidad de multiplicarse fuera de su hospedador y en alimentos durante el

procesado y conservación, es considerada una de las bacterias más ubicuas de la cadena alimentaria (13).



**Figura 2.** Fisión binaria de *Campylobacter*. Imagen de microscopía electrónica de transmisión (MET) cedida para esta tesis doctoral por D<sup>a</sup> Mary Parker, del Instituto de Investigación Alimentaria de Norwich, Reino Unido.

Con el objetivo de reducir el daño que produce el oxígeno sobre estas bacterias, los medios selectivos empleados en el laboratorio para el cultivo de *Campylobacter* contienen uno o más neutralizadores tales como sangre, hierro ferroso, etc. y agentes selectivos, particularmente antimicrobianos (14). Según cual sea la naturaleza de la muestra, las células de *Campylobacter* potencialmente dañadas pueden verse afectadas por el efecto inhibitorio de los agentes selectivos. En algunos protocolos es necesario utilizar un paso de enriquecimiento de la muestra con el objetivo de mantener un equilibrio entre la inhibición de microorganismos competidores y la recuperación específica de *Campylobacter* (15).

### 3.1.3 Genoma

Una colaboración entre la Escuela de Higiene y Medicina Tropical de Londres y el Instituto Sanger permitió, en el año 2.000, secuenciar por primera vez el genoma de *Campylobacter*. La definición de genoma engloba toda la información genética de un organismo, por lo que se refiere tanto al cromosoma como a los plásmidos, si los hubiera. La cepa secuenciada, *C. jejuni* NCTC11168, presentó un cromosoma circular de 1.461.481 pares de bases, un porcentaje de guanina-citosina del 30,6% y 1.654 posibles proteínas. Además se identificaron regiones hipervariables asociadas



con proteínas de membrana que podrían tener un papel crucial en la supervivencia de la bacteria (16).

Actualmente, el Centro Nacional para la Información Biotecnológica de los Estados Unidos (*The National Center for Biotechnology Information*, NCBI) posee 1.085 genomas de *C. jejuni* y 817 de *C. coli*. Basándonos en el total de genomas completos presentes en el NCBI (último acceso 19/06/2017), se muestran las características genómicas de *C. jejuni* y *C. coli* (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Valores promedio de características genómicas de *C. jejuni* y *C. coli*. Datos analizados según los genomas completos presentes en el NCBI (último acceso 19/06/2017).

|                        | <i>C. jejuni</i> | <i>C. coli</i> |
|------------------------|------------------|----------------|
| Tamaño del genoma (Mb) | 160              | 181,6          |
| Guanina-Citosina (%)   | 30,3             | 31,2           |
| Número de genes        | 1.762            | 1.902          |
| Número de proteínas    | 1.633            | 1.781          |

En relación a los plásmidos, en *Campylobacter* se conocen tres tipos: pVIR, pTET y plásmidos crípticos. El plásmido pVIR contiene genes del sistema de secreción tipo IV, el cual está involucrado en la exportación de ADN, conjugación bacteriana y secreción de proteínas (17, 18). El plásmido pTET contiene genes de resistencia a antimicrobianos (tetraciclina principalmente) y genes del sistema de secreción tipo IV, aunque en éste caso sólo se relaciona con procesos de conjugación bacteriana (19). Por último, los plásmidos crípticos son aquellos que no contribuyen al fenotipo de la bacteria ya que sólo poseen genes de replicación (20).

Desde la secuenciación del primer genoma bacteriano, el número de genomas disponibles ha aumentado considerablemente (21). Con el objetivo de almacenar y analizar datos de genomas bacterianos se ha creado la base de datos BIGSdb (*Bacterial Isolate Genome Sequence Database*) (22).

### 3.1.4 Metabolismo

El proceso de adquisición de nutrientes por parte de *Campylobacter* es lo suficientemente flexible como para permitir la supervivencia en el medio ambiente (heces, agua o alimentos) (23). Sin embargo, las bacterias del género *Campylobacter* no tienen la capacidad de utilizar los azúcares como fuente de carbono debido a que carecen del enzima clave de la glicólisis, la fosfofructoquinasa (16). Como sustrato nutricional utilizan aminoácidos y son capaces de metabolizar serina, prolina, aspartato y ácido glutámico (24-29). Sin embargo, no todas las cepas de *Campylobacter* pueden metabolizar glutamina o asparagina, por lo que los aislados que porten genes que les permitan metabolizar estos aminoácidos presentan cierta ventaja de colonización (27). En cuanto a la capacidad de metabolizar aminoácidos, no hay grandes diferencias entre *C. jejuni* y *C. coli* excepto en el uso del ácido aspártico, ya que un estudio ha puesto de manifiesto que el 20% de los aislados de *C. coli* no tienen la capacidad de metabolizar este aminoácido (30).

El metabolismo del aminoácido glutamina está limitado a los aislados de *Campylobacter* que porten el gen gamma glutamil transpeptidasa (*ggt*). La proteína que expresa el gen *ggt* es un enzima transmembrana, presente tanto en procariotas como eucariotas, e involucrada en el ciclo del gamma glutamilo (31). Este ciclo bioquímico da lugar a la síntesis y degradación de glutatión resultando en un sistema de transporte de aminoácidos a través de la membrana celular (32). El enzima GGT al reaccionar sobre la glutamina produce una molécula, el glutamato, capaz de entrar a la bacteria a través del transportador Peb1 (33). GGT es un enzima clave en la colonización de bacterias como *Helicobacter pylori* o *Neisseria meningitidis*, por participar en la síntesis de novo de aminoácidos esenciales permitiendo la supervivencia del microorganismo (34-36). En el caso de *Campylobacter*, aunque parece que la presencia del gen *ggt* no afecta a la colonización inicial en pollos, si se ha visto que favorece la persistencia de la bacteria en el intestino (25).

Respecto a la asparagina, la mayoría de los aislados de *Campylobacter* poseen un gen (*ansB*) encargado de expresar el enzima que metaboliza este aminoácido (33). Por tanto *Campylobacter* podría metabolizar la asparagina pero carece de transportador de este aminoácido transmembrana, ya que el enzima *ansB* se localiza en el citoplasma (27). Sin embargo, ciertos aislados de *Campylobacter* poseen una secuencia adicional (40 pares de bases ó pb) en el gen *ansB* que codifica un péptido señal que le permite situarse en la zona periplásmica. Así, los aislados que posean

proteínas ansB localizadas en el periplasma (ansB<sup>s</sup>) pueden utilizar asparagina ya que el producto de esta reacción (aspartato) puede pasar al interior de la bacteria a través del complejo Peb1 (27, 37). Estudios en ratones infectados experimentalmente con *Campylobacter* mostraron como aislados de *C. jejuni* carentes de ansB periplásmico muestran un defecto significativo de la colonización hepática (27).

Otro gen presente sólo en algunos aislados de *Campylobacter* y que interviene en su metabolismo es *fucP*. Como ya se ha mencionado, *Campylobacter* no puede metabolizar pentosas o hexosas como la glucosa, fructosa o la galactosa ni disacáridos como la lactosa o la maltosa entre otros (38, 39). Sin embargo los aislados que porten el gen *fucP* tienen la capacidad de obtener energía a partir de L-fucosa (40, 41). La vía catabólica de la fucosa en aislados de *Campylobacter* no está del todo clara pero se cree que genera piruvato y lactato (27).

Al final, el metabolismo de los aminoácidos glutamina y asparagina o del monosacárido fucosa, hace que se vean favorecidas las reacciones bioquímicas que den lugar a piruvato, oxalacetato y a partir de éstos fosfoenolpiruvato (42). A partir del fosfoenolpiruvato, *Campylobacter* puede sintetizar glucosa a través de la ruta gluconeogénica ya que posee todos los enzimas necesarios (16).

En cuanto a la cadena respiratoria, *Campylobacter* utiliza una gran variedad de aceptores y donadores de electrones tales como fumarato, nitrato, trimetilamina-N-óxido reductasa, DMSO y sulfito (43, 44). Determinados aislados de *Campylobacter* poseen genes relacionados con funciones respiratorias, como el gen *dmsA*, que pueden mejorar su capacidad de colonización del tracto digestivo de animales o personas (45). El gen *dmsA* codifica una subunidad de la trimetilamina-N-óxido reductasa y, junto con el gen de colonización *ggT*, está presente con mayor frecuencia en aislados de personas y pollos (46, 47).

**En esta tesis doctoral se ha evaluado la presencia de genes metabólicos en aislados ampliamente distribuidos en el medio ambiente y relacionados con campilobacteriosis humanas.**

### 3.2 Epidemiología

La principal fuente de infección por *Campylobacter* en personas es la carne de pollo, pero estas bacterias pueden encontrarse en gran variedad de aves y mamíferos ya que colonizan de forma asintomática el tracto digestivo de estos hospedadores (48).

Además, y a pesar de las restricciones metabólicas que presentan, se han identificado aislados de *Campylobacter* en ambientes acuáticos, los cuales pueden actuar como reservorios y focos de infección (49). Así, *Campylobacter* pone de manifiesto la necesidad de dar un enfoque de “una sola salud” a nuestro estudio, comparando los aislados procedentes del hombre, animales y el medio ambiente (concepto “*one health*”) (50).

La campilobacteriosis suele presentarse en forma de casos aislados aunque en ocasiones pueden producirse brotes epidémicos (51). El Centro Europeo de Control y Prevención de Enfermedades (*European Center for Disease Control and Prevention*, ECDC) define brote como dos o más casos en que el inicio de la enfermedad está estrechamente vinculado en el tiempo y en el espacio, donde se sospecha o evidencia de una fuente común de infección, con o sin apoyo microbiológico (52). Casi el 10% de los brotes de origen bacteriano que tuvieron lugar en Europa en el 2015 se produjeron por *Campylobacter*, siendo el segundo agente bacteriano mayoritario después de *Salmonella* (4).

### 3.2.1 Caracterización

En lo que respecta a la caracterización genética de *Campylobacter*, uno de los métodos de tipificación más usados en la actualidad es el MLST (*Multilocus Sequence Typing*) (3, 53, 54). Otras técnicas de tipificación usadas en esta bacteria son el PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) basada en el uso de enzimas de restricción y *flaA* (*flaA*-SVR, *short variable región*) técnica fundamentada en la secuenciación del gen de la flagelina (55). Otro método de comparación genómica es la identificación de polimorfismos de nucleótido único (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) (56).

La técnica de MLST es la que se ha utilizado como método de tipificación en esta tesis doctoral. Está basada en la secuenciación de una región interna de siete genes conservados (*asp*, *glnA*, *gltA*, *glyA*, *pgm*, *uncA* y *tkt*) que permite la obtención de un perfil alélico o secuencia tipo (*Sequence Type*, ST) (57). Cada alelo corresponde con un número asignado en base a la comparación con secuencias de estos siete genes presentes en una base de datos pública denominada PubMLST (<http://pubmlst.org/campylobacter/>).

Se han descrito entre 300 y 600 variantes alélicas de cada uno de los siete genes, formando más de 5.500 combinaciones o STs (3). Los aislados de *Campylobacter* que compartan cuatro o más alelos de los siete, están comprendidos dentro del mismo complejo clonal (*Clonal Complex*, CC); los aislados que pertenecen al mismo CC comparten un ancestro común y a menudo presentan propiedades fenotípicas iguales (58). Los diferentes CCs que forman la estructura poblacional de *C. jejuni* y *C. coli* se muestran en el apartado 3.2.2: Estructura poblacional.

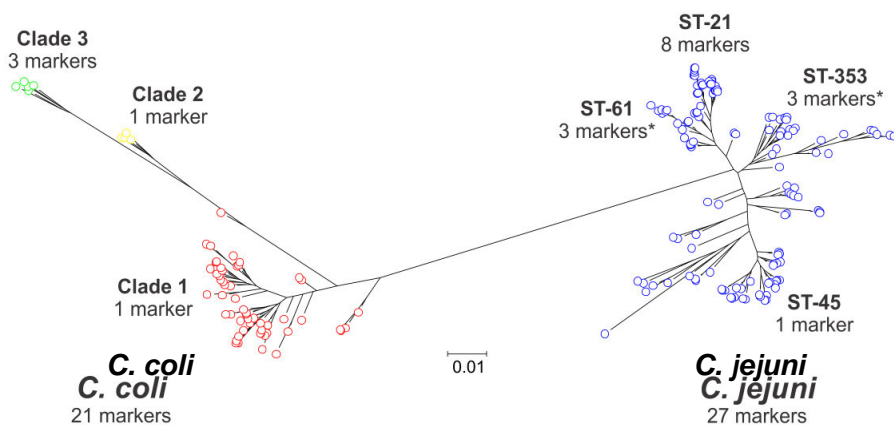
Un análisis alternativo para investigar la base genética de diversas bacterias como *Campylobacter* ha sido el estudio denominado gen-por-gen (3). Esta aproximación sigue el mismo procedimiento que el MLST pero en lugar de utilizar sólo siete genes, compara todo el genoma. Se compara cada gen de un aislado con toda la diversidad conocida de ese *locus* y se le asigna un valor según el alelo que representa. Este método puede usarse para analizar filogenias entre aislados altamente divergentes, por ejemplo los de diferentes especies dentro del mismo género (59, 60). El análisis de MLST basado en la secuencia completa del genoma (*whole genome MLST*) permite analizar simultáneamente cientos de genomas y se ha implementado en varios géneros bacterianos, entre los que se incluye *Campylobacter* (54). Estos estudios permiten conocer las características genéticas de aislados de *Campylobacter* pertenecientes a una población concreta. Comparaciones entre los diferentes aislados establecen las bases para analizar posibles transferencias genéticas y mecanismos de adaptación al hospedador.

### 3.2.2 Estructura poblacional

Las especies *C. jejuni* y *C. coli* comparten alrededor del 85% de su genoma y aparentemente habitan el mismo nicho ecológico, el tracto gastrointestinal de mamíferos y aves. Sin embargo, su estructura poblacional es muy diferente, ya que *C. jejuni* presenta un gran número de CCs mientras que *C. coli* es menos diverso y está organizado en tres clados (**Figura 3**) (3). Un clado, del griego *κλαδος*-clados (rama), es como se denomina en biología al conjunto de unidades de un árbol filogenético que poseen un antepasado común (61).

Ciertos genotipos de *Campylobacter* se asocian con animales de granja e infecciones en personas, mientras que otros están asociados con el medio ambiente y animales salvajes (62, 63). Se ha estimado que un 80% de los CCs asociados con infecciones en personas han sido también identificados en muestras de pollo (64, 65). En el caso

de *C. jejuni*, el CC-21 es uno de los más representados y se asocia frecuentemente con casos de enfermedad humana así como con una amplia gama de animales (66, 67). Por otro lado, determinados CCs de *C. jejuni* están asociados con el hospedador, como son CC-61 y CC-257 en bovino y pollos respectivamente (68). En el caso de *C. coli*, el CC-828 representa el genotipo mayoritario de esta especie y se identifica en muestras de personas, animales y medio ambiente (3). Los principales CCs de *Campylobacter* identificados en personas y animales de abasto en cada continente se muestran en la **Tabla 2**.



**Figura 3.** Árbol filogenético de 192 genomas de *Campylobacter*. Se muestran los tres clados de *C. coli* (clado 1: rojo, clado 2: amarillo y clado 3: verde). La barra de escala indica el número estimado de sustituciones. Figura tomada del artículo (60).

**Tabla 2.** Representación de los cinco CCs mayoritarios de *C. jejuni* y *C. coli* en personas, pollos, ganado porcino y bovino de cada continente. Los datos de América corresponden a América del Norte. Fuente: *Bacterial Isolate Genome Sequence Database* (BIGSdb).

| Continente | Origen              | CCs (%)            |                    |                    |             |                   |
|------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------|-------------------|
| África     | Personas (n=98)     | <b>CC-828</b> (27) | CC-362 (14)        | CC-353 (11)        | CC-460 (7)  | CC-22 (7)         |
|            | Pollos (n=70)       | <b>CC-828</b> (30) | CC-353 (20)        | CC-460 (14)        | CC-354 (10) | CC-574 (6)        |
|            | Bovino (n=11)       | <b>CC-828</b> (55) | CC-460 (27)        | CC-252 (9)         | CC-658 (9)  |                   |
| América    | Personas (n=930)    | CC-21 (26)         | CC-45 (11)         | CC-353 (10)        | CC-48 (7)   | <b>CC-828</b> (7) |
|            | Pollos (n=729)      | <b>CC-828</b> (34) | CC-45 (13)         | CC-607 (13)        | CC-353 (12) | CC-21 (10)        |
|            | Porcino (n=359)     | <b>CC-828</b> (98) | CC-21 (2)          |                    |             |                   |
|            | Bovino (n=605)      | CC-21 (26)         | <b>CC-828</b> (25) | CC-42 (20)         | CC-61 (11)  | CC-403 (5)        |
| Asia       | Personas (n=741)    | CC-21 (13)         | CC-52 (11)         | CC-354 (10)        | CC-353 (9)  | <b>CC-828</b> (9) |
|            | Pollos (n=591)      | CC-21 (18)         | CC-353 (15)        | <b>CC-828</b> (12) | CC-45 (10)  | CC-354 (8)        |
|            | Porcino (n=88)      | <b>CC-828</b> (85) | CC-21 (8)          | CC-48 (2)          | CC-403 (2)  |                   |
|            | Bovino (n=114)      | <b>CC-828</b> (23) | CC-21 (18)         | CC-42 (11)         | CC-607 (8)  | CC-353 (5)        |
| Europa     | Personas (n=13.700) | CC-21 (27)         | CC-257 (9)         | <b>CC-828</b> (9)  | CC-48 (8)   | CC-45 (7)         |
|            | Pollos (n=4.476)    | <b>CC-828</b> (26) | CC-21 (16)         | CC-45 (12)         | CC-257 (7)  | CC-661 (4)        |
|            | Porcino (n=588)     | <b>CC-828</b> (93) | CC-403 (6)         |                    |             |                   |
|            | Bovino (n=1.128)    | CC-21 (30)         | CC-61 (22)         | CC-42 (12)         | CC-48 (10)  | CC-45 (5)         |
| Oceanía    | Personas (n=1.689)  | CC-21 (26)         | CC-48 (22)         | CC-45 (16)         | CC-61 (7)   | CC-42 (5)         |
|            | Pollos (n=1.716)    | CC-45 (30)         | CC-21 (23)         | CC-48 (17)         | CC-354 (10) | <b>CC-828</b> (6) |
|            | Porcino (n=10)      | <b>CC-828</b> (40) | CC-48 (40)         | CC-21 (10)         | CC-257 (10) |                   |
|            | Bovino (n=318)      | CC-21 (39)         | CC-61 (17)         | CC-42 (15)         | CC-403 (7)  | CC-48 (6)         |

CCs: Complejos clonales; n: número de aislados de *Campylobacter*  
CCs correspondientes a *C. coli* se muestran en formato negrita.

### 3.2.3 Principales hospedadores

Las especies *C. jejuni* y *C. coli* están ampliamente distribuidas en la naturaleza, colonizando el tracto digestivo de aves y mamíferos, tanto salvajes como domésticos (50). Las aves de corral, como pollos o pavos, son el portador más común de *Campylobacter* spp., aunque *Campylobacter* también coloniza otros animales domésticos como el ganado bovino o porcino (48, 69, 70). En términos generales, los animales no desarrollan la enfermedad pero estos microorganismos contaminan alimentos de origen animal tales como carne o leche (71). La principal fuente de campilobacteriosis humana es el consumo de carne de pollo cruda o poco cocinada y según datos de la EFSA, el 46,7% de las muestras de carne fresca de *broiler* analizadas en la UE fueron positivas a *Campylobacter* en 2015 (4, 72).

La frecuencia de detección de *Campylobacter* en ganado bovino varía significativamente pero se le atribuyen alrededor del 19% de los casos de campilobacteriosis en personas (73). La frecuencia de detección de estos microorganismos en porcino es más alta que en bovino aunque el impacto sobre la infección en humanos es mucho menor, alrededor del 2% de los casos de campilobacteriosis son atribuidas al consumo de carne de cerdo (57). También se han aislado especies de *Campylobacter* en ovejas, cabras y animales de compañía como perros y gatos (74, 75). Aves acuáticas, buitres y jabalís son ejemplos de animales salvajes en los que se ha aislado *Campylobacter*, aunque la importancia de estos animales como reservorio de infección es aparentemente limitada (76-79).

En cuanto a *C. jejuni* y *C. coli*, la proporción de cada especie difiere según el hospedador. En muestras cecales de pollos o pavos, aunque no hay grandes diferencias entre el porcentaje de aislamiento de ambas especies, *C. jejuni* es mayoritario (80, 81). Lo mismo ocurre en muestras de bovino, aunque en este caso la diferencia entre ambas especies es mayor ya que el porcentaje de aislados de *C. jejuni* supera el 75% respecto a *C. coli* (82-84). La gran diferencia se encuentra en ganado porcino ya que se encuentran aislados de *C. coli* en casi el 100% de las muestras positivas (85, 86). Diferentes factores como el método de aislamiento, la edad de los animales o el tamaño del rebaño pueden ser responsables de las diferencias en las tasas de aislamiento de especies termófilas de *Campylobacter* (80, 87). La diferente proporción de aislados de *Campylobacter* termófilos se ve reflejada en la carne de pollo, donde *C. jejuni* prevalece sobre *C. coli* (88-90). Sin



embargo, datos sobre carne de pavo contaminada muestran un mayor porcentaje de aislados de *C. coli* respecto a *C. jejuni* (89).

Además de carne contaminada, hay otros alimentos identificados como fuente de campilobacteriosis en humanos como la leche, frutas y verduras, principalmente debido a su contaminación ocasional por contacto con animales, agua no tratada o por contaminación cruzada con otros alimentos (91-95). El agua contaminada es otra fuente de infección de *Campylobacter* en personas o animales domésticos (96). La contaminación del agua por *Campylobacter* se debe normalmente a residuos fecales de aves salvajes o domésticos, al vertido de derivados de la producción animal y al vertido de aguas de depuradora (49, 97). El agua junto con la carne de pollo contaminada, es uno de los principales causantes de brotes producidos por *Campylobacter* (51). En los últimos treinta años se identificaron en Inglaterra y Gales 25 brotes de campilobacteriosis asociados con sistemas públicos de agua potable, poniendo de manifiesto la importancia de un tratamiento apropiado de las aguas (98).

### 3.3 Aspectos clínicos de la infección en personas

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera a *Campylobacter* como la bacteria más común causante de gastroenteritis de transmisión alimentaria en todo el mundo (2). La campilobacteriosis tiene una marcada estacionalidad, las infecciones aumentan en los meses más cálidos del año y los grupos de personas en los que la incidencia suele ser superior son jóvenes y adultos de entre 15-44 años y niños menores de 4 años (23, 50, 99). En países en vías de desarrollo la enfermedad es considerada esencialmente pediátrica, afectando principalmente a niños menores de 2 años; es común el aislamiento de la bacteria en niños asintomáticos (100). La dosis infectiva es relativamente baja; un estudio ha mostrado como dosis de 800 UFC (Unidades Formadoras de Colonias) de *C. jejuni* dieron lugar a diarrea en un grupo de voluntarios (101).

El cuadro clínico en las personas infectadas con *C. jejuni* o *C. coli* tiene como síntomas principales diarrea, fiebre, dolor abdominal y pérdida de peso (102). Se trata de una enfermedad auto-limitante y la sintomatología suele prolongarse durante 5-6 días (103). Aunque la gastroenteritis es el principal síntoma de la infección ocasionada por *Campylobacter*, estos organismos han sido asociados con otras patologías del tracto digestivo como enfermedad inflamatoria del

intestino, celiacía y colecistitis (104-106). Como manifestaciones clínicas no asociadas con el sistema digestivo, el síndrome de Guillain-Barré es una de las manifestaciones clínicas más relacionadas con la infección por *Campylobacter* además del síndrome de Miller Fisher, bacteriemia y septicemia, pericarditis, meningitis, artritis reactiva y abortos (102, 107-112).

El tratamiento frente a una campilobacteriosis suele basarse en la reposición de líquidos y electrolitos. Ocasionalmente la infección evoluciona negativamente y puede ser necesario un tratamiento antimicrobiano (51). La ciprofloxacina suele utilizarse como tratamiento empírico frente a gastroenteritis, aunque en el caso de campilobacteriosis los macrólidos y especialmente la eritromicina se consideran el tratamiento de elección (113).

### **3.4 Resistencia a antimicrobianos**

La resistencia a los antimicrobianos es la capacidad que tienen los microorganismos de evitar el efecto de los antimicrobianos. Hay microorganismos que producen antimicrobianos (antibióticos), lo que les permite limitar el crecimiento de sus competidores sin que ellos se vean afectados por poseer un mecanismo de resistencia (114). Hasta el descubrimiento de los antimicrobianos, se produjeron infecciones de origen bacteriano devastadoras para el hombre en Egipto, Grecia y China (115). Con el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1928, nace la era antibiótica en la que surge la medicina moderna y los antimicrobianos salvan millones de vidas (116). Pocos años más tarde, en la década de los 50, surgen los primeros aislados de *Staphylococcus* resistentes a penicilina por lo que los avances de la década anterior se vieron amenazados (117). La comunidad científica, consciente del problema que suponían las bacterias resistentes a antimicrobianos, pone en marcha líneas de investigación destinadas a la identificación de nuevos antimicrobianos. El periodo entre los años 1940 y 1980 es conocido como la era dorada de los antibióticos debido al descubrimiento de la mayoría de los antimicrobianos que hoy conocemos (118). Desde el descubrimiento del primer microorganismo resistente a penicilina, no ha cesado la identificación de nuevos mecanismos de resistencia, incluso bacterias resistentes a varias familias de antimicrobianos (119).

Recientemente la OMS ha publicado una lista con las doce familias bacterianas que más amenazan la salud humana debido a sus resistencias a antimicrobianos

(120). La lista de la OMS tiene como objetivo orientar y fomentar la investigación y el desarrollo de nuevos fármacos y en base a esta necesidad ha dividido la lista en tres niveles según la prioridad: crítico, elevado y medio. De acuerdo con esta clasificación, el género *Campylobacter* es considerado como un patógeno de prioridad elevada debido a sus resistencias a antimicrobianos.

En los siguientes apartados se presenta una revisión de las familias de antimicrobianos utilizadas en la caracterización de los aislados de *Campylobacter* de esta tesis doctoral. Se han seleccionado quinolonas, tetraciclinas, macrólidos y aminoglucósidos por ser las familias que forman parte del panel de antimicrobianos utilizado por la EFSA en la vigilancia de las resistencias a antimicrobianos en agentes zoonóticos (121). Se resume en cada caso los mecanismos que dan lugar a resistencia a cada familia de antimicrobianos.

Todos los mecanismos de resistencia a antimicrobianos se pueden agrupar en tres categorías: (I) reducción del antimicrobiano en el interior de la bacteria, (II) inactivación del antimicrobiano y (III) modificación de la diana sobre la que actúa el antimicrobiano (122). En el primero de los casos, la bacteria controla la cantidad de antimicrobiano que hay en su interior impidiendo su entrada (porinas) o expulsándolo al exterior (bombas de eflujo) (123). La segunda categoría de mecanismos de resistencia se basa en la presencia de genes capaces de expresar enzimas que degradan o modifican el antimicrobiano (124). Por último está la estrategia de modificar la diana molecular de actuación del antimicrobiano, por mutaciones o metilaciones, impidiendo así que éste actúe sobre la bacteria (125).

Una bacteria que posea resistencia a antimicrobianos mediada por mutaciones específicas, transmitirá ese mecanismo de resistencia a sus células hijas por transferencia vertical. En cambio, los mecanismos de resistencia ubicados en elementos genéticos móviles tipo plásmidos, transposones e integrones se pueden transferir además de forma horizontal de una bacteria a las células que comparten el mismo nicho ecológico (126). En el caso de *Campylobacter*, se han identificado islas genómicas, capaces de transferirse de una bacteria a otra, que portan genes de resistencia a diferentes antimicrobianos (127).

Según cómo se realice la transferencia del mecanismo de resistencia, el poder de diseminación es diferente. Por transferencia vertical el mecanismo de resistencia está limitado a una línea genética pero por transferencia horizontal el alcance de la resistencia puede llegar a ser mucho mayor (128). Por todo esto, parte de los

trabajos de esta tesis doctoral se han enfocado en el estudio de genes de resistencia a antimicrobianos, con el objetivo de conocer su presencia en *Campylobacter* aislados de animales, personas y aguas residuales.

### 3.4.1 Quinolonas

Las quinolonas son un grupo de agentes quimioterapéuticos sintéticos, es decir, no son producidos por microorganismos, a diferencia de los antibióticos. Estos antimicrobianos son sustancias bactericidas utilizadas en todo el mundo pero el incremento de resistencias en diferentes especies bacterianas hace que su uso se vea amenazado (129). Se dice que son bactericidas porque producen la lisis y muerte de la bacteria mientras que los antimicrobianos bacteriostáticos, son aquellos que inhiben el crecimiento bacteriano (130). Actúan sobre los enzimas ADN girasa y topoisomerasa IV inhibiendo la síntesis de ADN y produciendo la muerte de la bacteria (131). El primer miembro descrito de este grupo fue el ácido nalidíxico y su uso en clínica se centró en infecciones del tracto urinario causadas por bacterias entéricas (132). En la década de los 80 se desarrolló la segunda generación de estos fármacos y se les denominó fluoroquinolonas por la introducción de un flúor en su estructura molecular. De las fluoroquinolonas cabe destacar la ciprofloxacina por ser la primera de su clase en mostrar actividad significativa fuera del tracto urinario (133).

En *Campylobacter*, el principal mecanismo de resistencia a estos antimicrobianos es la mutación C257T en el gen *gyrA*, la cual produce un cambio de treonina por isoleucina en la posición 86 del enzima girasa (134). Otro mecanismo de resistencia a quinolonas, tetraciclina y macrólidos, son las bombas de eflujo *cmeABC*, como veremos más adelante. Este sistema de bombas *cmeABC* constituyen un sistema de proteínas transmembrana capaz de expulsar el antibiótico al exterior de la bacteria y se produce un efecto sinérgico sobre la resistencia a quinolonas con la mutación del gen *gyrA* (135).

El porcentaje de aislados de *Campylobacter* resistentes a ciprofloxacina es elevado, y España es el segundo país con mayores niveles de resistencia en *C. jejuni* aislados de personas, seguido de Portugal (121). Según los últimos datos de la EFSA sobre resistencia a antimicrobianos en agentes zoonóticos, el porcentaje de *C. jejuni* resistentes a ciprofloxacina aislados de personas es del 90,4% y en pollo de engorde 69,8% (121, 136). En el caso de *C. coli*, el porcentaje de aislados

resistentes a este antibiótico en personas es del 70,6%, en pollos es del 74,3% y en ganado porcino (cerdo de engorde) del 62,1% (121, 136).

### 3.4.2 Tetraciclinas

Las tetraciclinas son antimicrobianos bacteriostáticos de amplio espectro pero su utilidad se está viendo reducida debido a que los genes de resistencia a este fármaco son los más frecuentemente encontrados en la naturaleza (137, 138). Las tetraciclinas se unen a los ribosomas impidiendo la correcta síntesis de proteínas y afectando a la viabilidad de la bacteria (139).

La resistencia a tetraciclina en *C. jejuni* y *C. coli* está codificada por el gen *tet(O)* y este suele localizarse en plásmidos aunque también puede encontrarse insertado en el cromosoma (140, 141). El gen *tet(O)* codifica una proteína que protege el ribosoma e impide la unión con el antibiótico. La presencia de este gen en plásmidos conjugativos explicaría su alta distribución en todo el mundo (142). Como se ha mencionado en el apartado anterior, la bomba de eflujo CmeABC también se considera un mecanismo de resistencia a tetraciclina en *Campylobacter* (143).

Según datos de la EFSA el porcentaje de *C. jejuni* resistentes a tetraciclina aislados de personas es del 44,6% en Europa y del 78,5% en España, mientras que en aislados de pollos de engorde el porcentaje de resistencia es 54,4% (121, 136). En el caso de *C. coli* aislados de personas el porcentaje de resistencia a tetraciclina es del 68,8% según los datos europeos y 92,7% en España (121). Los datos europeos sobre resistencia en *C. coli* aislados de ganado porcino (cerdo de engorde) son del 66,6% y de 59,6% en pollos (121, 136).

### 3.4.3 Macrólidos

Los macrólidos son antimicrobianos bacteriostáticos que actúan contra bacterias grampositivas, cocos gramnegativos y bacterias intracelulares. Los macrólidos se unen al ARN ribosomal 23S, componente principal de la subunidad 50S, e inhiben la síntesis de proteínas bacterianas (144). A continuación nos referiremos al primer macrólido identificado, la eritromicina, por ser el tratamiento de elección frente a campilobacteriosis en personas. Los bacilos gramnegativos son generalmente resistentes debido a la impermeabilidad de su membrana celular, excepto *Bordetella pertussis*, *Campylobacter*, *Chlamydia*, *Helicobacter* y *Legionella* (145).

La resistencia a eritromicina en *Campylobacter* se produce como resultado de modificar la unión del antibiótico al ribosoma, bien por mutaciones o metilaciones específicas, o por la expulsión del antibiótico al exterior de la bacteria. El principal mecanismo de resistencia a eritromicina en *Campylobacter* es la mutación A2075G del gen 23S (146). También las mutaciones A2074C, A2074G y A2074T producen altos niveles de resistencia a eritromicina pero su frecuencia de detección es mucho menor debido a que afectan a la viabilidad de la bacteria (147). *Campylobacter* posee tres copias del gen 23S y generalmente los aislados resistentes presentan la mutación en los tres genes, aunque la coexistencia con alelos no mutados no produce diferentes grados de sensibilidad (141, 148).

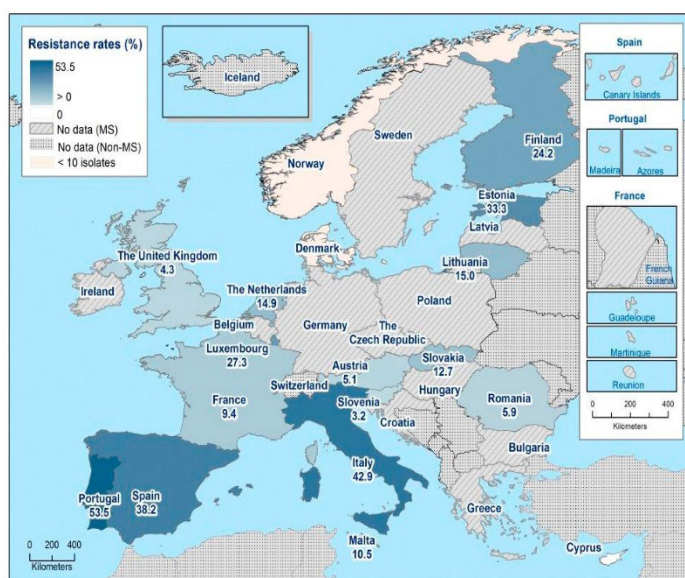
El segundo mecanismo de resistencia es el producido por el gen *erm(B)*, que codifica una metilasa, que hace a la bacteria que lo porta resistente a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas de tipo B (fenotipo MLS<sub>B</sub>) (149). El gen *erm(B)* fue identificado por primera vez en *Campylobacter* en el año 2014 en China y se ha detectado en cepas aisladas de pollos, cerdos, patos y personas (127, 150). En Europa este gen se ha identificado en *C. coli* aislados de pollos y de pavos de engorde de España y ambos estudios forman parte de esta tesis doctoral (151).

El gen *erm(B)* puede transferirse horizontalmente entre *C. coli* y *C. jejuni* y se asocia en todos los casos con islas genómicas que portan además otros genes de resistencia a antimicrobianos (127, 150, 151). Más adelante, en el apartado 3.4.5., se describen en detalle las islas genómicas de multirresistencia identificadas en *Campylobacter*. Tanto las mutaciones del gen 23S como el gen *erm(B)* son capaces de producir altos niveles de resistencia a macrólidos, con valores de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) superiores a 512 mg/L (151).

El tercer mecanismo de resistencia a eritromicina en *Campylobacter* se debe a cambios (mutaciones, inserciones y deleciones) en las proteínas ribosomales L4 y L22 pero la relación entre este mecanismo y el fenotipo es dudosa (152). Hay aislados con bajo nivel de resistencia a eritromicina (8-16 mg/L) con modificaciones en L4 y/o L22 y bomba de eflujo CmeABC como únicos mecanismos de resistencia a eritromicina. En estos aislados la inactivación de las bombas de eflujo produce susceptibilidad a la eritromicina, lo que sugiere la participación de cmeABC en la resistencia intrínseca de *Campylobacter* (153, 154).

El porcentaje medio de aislados de *C. jejuni* resistentes a eritromicina en Europa durante el año 2015 fue mucho menor que los aislados de *C. coli* (1,5% y 14,4%

respectivamente). La distribución de *C. coli* resistentes a eritromicina en Europa se muestra en la **Figura 4**. El porcentaje de aislados multirresistentes, aquellos que muestran resistencia a tres o más clases de antimicrobianos, son superiores en *C. coli* que en *C. jejuni* (121). La multirresistencia (generalmente a ciprofloxacina, eritromicina y tetraciclina) se ha observado principalmente en aislados de *C. coli* procedentes de España y de Portugal. En aislados de *Campylobacter* de pollos de engorde de la UE, el porcentaje de resistencia a eritromicina también es superior en *C. coli* (14,5%) que en *C. jejuni* (5,9%). Esta tendencia se mantiene en cepas aisladas de pavos de engorde (43,3% *C. coli* y 2,5% en *C. jejuni*) mientras que en aislados de cerdos de engorde solo se dispone de datos de *C. coli* donde el porcentaje es 21,6%, debido a que prácticamente no se aísla *C. jejuni* de este hospedador (85, 86).



**Figura 4.** Distribución espacial de *C. coli* resistentes a eritromicina aislados de personas en 2015 (121).

### 3.4.4 Aminoglucósidos

Tras su descubrimiento, los aminoglucósidos constituyeron el tratamiento de elección frente a tuberculosis, como fue el caso de la estreptomina, además de infecciones producidas por bacterias aerobias gramnegativas y algunas

grampositivas (155). Cuando se usan frente a grampositivos suelen combinarse con otros antimicrobianos, como los  $\beta$ -lactámicos, ya que tienen un efecto sinérgico (156). Los aminoglucósidos son sustancias bactericidas que se unen a los ribosomas bacterianos alterando la correcta síntesis de proteínas (157).

La resistencia a aminoglucósidos está mediada por enzimas que modifican el antibiótico, mediante fosforilación, adenilación o acetilación, reduciendo su afinidad por el ribosoma (158). El primer gen de resistencia a aminoglucósidos identificado en aislados de *Campylobacter* spp. fue el gen de resistencia a kanamicina *aph*(3')-III, en el año 1985 (159). En la **Tabla 3** se muestran los genes de resistencia a aminoglucósidos identificados en *C. jejuni* y *C. coli* cronológicamente. Estos genes pueden codificar tres tipos de enzimas: fosfotransferasas (APH), acetiltransferasas (AAC) y nucleotidil/adenililtransferasas (ANT) (160).

Debido a que *Campylobacter* es considerado un patógeno de nivel crítico debido a las resistencias a antimicrobianos que presenta (161), se están desarrollando estudios *in vitro* para buscar nuevos tratamientos frente a la campilobacteriosis y la gentamicina podría ser una alternativa viable. Desafortunadamente y como muestra la **Tabla 3**, ya se han identificado genes de resistencia a gentamicina en aislados de *Campylobacter*, como es el gen *aph-2*.

**Tabla 3.** Genes de resistencia a aminoglucósidos identificados en *C. jejuni* o *C. coli* cronológicamente.

| Gen                          | Resistencia                      | Año  | Referencia |
|------------------------------|----------------------------------|------|------------|
| <i>aphA-3</i>                | Kanamicina                       | 1988 | (162)      |
| <i>aphA-7</i>                | Kanamicina                       | 1989 | (163)      |
| <i>ant</i> (6) ó <i>aadE</i> | Estreptomicina                   | 1990 | (164)      |
| <i>ant</i> (3) ó <i>aadA</i> | Estreptomicina y Espectinomicina |      |            |
| <i>sat-4</i>                 | Estreptotricina                  | 1994 | (165)      |
| <i>aadE-sat4-aphA3</i>       | Estreptotricina y Kanamicina     | 2004 | (166)      |
| <i>ant</i> (9) ó <i>aad9</i> | Espectinomicina                  | 2005 | (167)      |
| <i>aph-2</i>                 | Gentamicina                      |      |            |
| <i>aac</i>                   | Kanamicina                       |      |            |
| <i>aacA-aphD</i>             | Kanamicina y Gentamicina         | 2016 | (160)      |
| <i>ant-like</i>              | Estreptomicina                   |      |            |



Existen diferentes variantes del gen *aph-2* y cada una de ellas parece estar asociada a un hospedador específico excepto el gen *aph-2* Ig. La variante *aph-2* Ig fue identificada por primera vez en el año 2008, en carne de pollo y en el 2009 se identificó en personas; dos años más tarde la presencia de este gen en *C. coli* aislados tanto de personas como de animales había aumentado considerablemente (127, 168, 169). Por otro lado las variantes *aph-2* If y *aph-2* Ih sólo han sido identificadas en *C. jejuni* aislados de personas (170).

De los antimicrobianos testados por la EFSA en la evaluación de antibiorresistencias en *Campylobacter*, la gentamicina es el que ofrece menor porcentaje de resistencia, con un 0,8% de resistencia en *C. jejuni* y 1,7% en *C. coli* (en España 2,2% y 9,1% respectivamente) aislados de personas en la UE. Los datos de resistencia a este antibiótico en *Campylobacter* aislados de animales también se mantienen muy bajos (0,9%) y bajos (2,6%) en *C. jejuni* y *C. coli* aislados de pollos de engorde, respectivamente. Los datos de resistencia en *C. coli* aislados de cerdos muestran un 3,6% de resistencia a gentamicina (10,6% en España) (121, 136).

### 3.4.5 Islas genómicas de multirresistencia

En *Campylobacter*, los genes de resistencia de transferencia horizontal se habían identificado en plásmidos, integrones y transposones. Estos genes, principalmente genes de resistencia a aminoglucósidos, parecen estar asociados en un mismo segmento de ADN (166, 167). En el año 1999 se aisló de un caso de diarrea de un soldado estadounidense trasladado de Tailandia, una cepa de *C. jejuni* multirresistente. El aislado de *C. jejuni* portaba un plásmido con nueve genes de resistencia a aminoglucósidos y pudo ser movilizado a una cepa de *E. coli* donde expresó resistencia a múltiples antimicrobianos del grupo de los aminoglucósidos (167).

En el año 2012 se identificaron en 26 *C. coli* aislados de pollos en China, múltiples genes de resistencia a aminoglucósidos. Estos genes se encontraban asociados a una secuencia de ADN o isla genómica insertada en el cromosoma y con capacidad de movilizarse a *C. jejuni* por transformación natural (171). También en China en el año 2014 se identificó en un *C. coli* aislado de pollos una isla genómica con genes de resistencia a aminoglucósidos y a macrólidos, concretamente el gen de resistencia a eritromicina *erm(B)* (127). A la resistencia que ofrecía la isla genómica

frente a los aminoglucósidos había que sumarle la resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas del grupo B, fenotipo que produce el gen *erm*(B) (145). El gen de resistencia a eritromicina *erm*(B) se ha identificado en *C. coli* aislados de animales y personas y en un *C. jejuni* aislado de pollos, todos ellos procedentes de China (150, 172).

Casi desde el descubrimiento de los primeros mecanismos de resistencia a antimicrobianos en *Campylobacter* se empezaron a proponer hipótesis sobre el flujo de genes desde bacterias grampositivas a gramnegativas (159, 173). Las islas genómicas, son un potencial vehículo de transferencia de genes de resistencia a antimicrobianos desde microorganismos grampositivos a gramnegativos (174).

Para *Campylobacter*, las islas genómicas suponen una vía de captación y dispersión de genes de resistencia a diferentes antimicrobianos, incluso la eritromicina. En parte de los trabajos de esta tesis doctoral se han analizado aislados de *Campylobacter* con sensibilidad reducida a eritromicina, identificando la presencia del gen *erm*(B) y las islas genómicas que lo contienen.

Estudiar las líneas genéticas y los perfiles de colonización presentes en *Campylobacter*, así como los mecanismos de resistencia a antimicrobianos, permite estudiar la diseminación de estos microorganismos en la naturaleza y el riesgo que suponen para la salud pública.



## 4.OBJETIVOS



En el presente trabajo de investigación se han caracterizado aislados de *Campylobacter* termófilos, según su genoma y sus genes de resistencia a antimicrobianos, procedentes de i) animales de abasto (pollos, pavos, ganado porcino y ganado bovino), ii) pacientes con campilobacteriosis y iii) aguas residuales.

#### **4.1 Objetivo I: Estudio de la diversidad genética de *C. jejuni*.**

La tipificación de aislados de *C. jejuni* por MLST ha permitido caracterizar la estructura genética de su población y ratificar que presenta más diversidad genética que *C. coli*. En diferentes países de la UE se ha observado una distribución similar de STs en personas y animales, siendo el CC-21 y el CC-45 los más frecuentemente aislados. A pesar de esto, los mecanismos de colonización de *Campylobacter* siguen siendo poco conocidos. La diversidad de perfiles metabólicos podría aportar nuevos conocimientos sobre los mecanismos de colonización y la estructura poblacional de *Campylobacter*.

Así, como parte del objetivo I se ha desarrollado el siguiente estudio:

- Primer estudio de investigación: Polimorfismo genómico, genes de virulencia y perfiles metabólicos en *Campylobacter jejuni* aislados de pollos.

#### **4.2 Objetivo II: Detección del gen de resistencia a eritromicina *erm(B)* en *Campylobacter* aislados de animales de abasto y aguas residuales.**

La descripción del gen *erm(B)*, nuevo mecanismo de resistencia identificado en aislados de *Campylobacter* procedentes de China, y su asociación con islas genómicas de multirresistencia dio lugar a su búsqueda en aislados de una colección con baja sensibilidad a eritromicina procedente de España.

Como parte del objetivo 2 se han desarrollado los siguientes estudios:

- Segundo estudio de investigación: Primera descripción del gen *erm(B)* en *Campylobacter coli* aislado en Europa.
- Tercer estudio de investigación: Identificación del gen de resistencia a eritromicina *erm(B)* en *Campylobacter coli* aislados de pavos y estudio de las posibles especies bacterianas involucradas en su transferencia horizontal.

### **4.3 Objetivo III: Caracterización genómica y genes de resistencia a antimicrobianos en *Campylobacter* aislados de personas, animales de abasto y aguas residuales.**

Este estudio surge del interés de comparar la diversidad genética existente en islas genómicas de multirresistencia de aislados de personas, animales de abasto y aguas residuales, para ver posibles relaciones entre los aislados, sus mecanismos de transferencia de resistencia (islas genómicas) y los propios determinantes de resistencia.

Así, dentro del presente objetivo se ha desarrollado el siguiente estudio:

- Cuarto estudio de investigación: Caracterización genómica y resistoma de *C. jejuni* y *C. coli* aislados de personas, animales y aguas residuales.

## 5.OBJECTIVES





*The main aim of this thesis was the characterization of thermophilic Campylobacter isolates from i) food animals (poultry, turkey, swine and cattle), ii) humans and iii) wastewater, according to their genomes and antimicrobial resistance genes.*

This thesis is structured according to the objectives described below:

### **5.1 Objective I: Study of the genetic diversity of *C. jejuni*.**

The comparison of *C. jejuni* isolates by MLST has allowed the characterization of the genetic structure of its population and has evidenced the presence of a higher genetic diversity respect to *C. coli*. A similar distribution of STs in humans and animals has been observed in different EU countries, with CC-21 and CC-45 being the most frequently isolated. In spite of this, the mechanisms of colonization remain little known. The diversity of metabolic gene profiles could provide new insights into the mechanisms of colonization and the population structure of *Campylobacter*.

Thus, as part of objective I, the following study was carried out:

- First research study: Genomic polymorphism, virulence genes and metabolic profiles of *Campylobacter jejuni* ST-45 isolated from poultry.

### **5.2 Objective II: Detection of the erythromycin resistance gene *erm*(B) in *Campylobacter* isolates from food animals and wastewater.**

The *erm*(B) gene was recently described as a new mechanism of erythromycin resistance in *Campylobacter* isolates from China and it was associated with multiresistance genomic islands. The possible impact of this discovery on the treatment of the campylobacteriosis, led us to evaluate its presence in isolates with low sensitivity to erythromycin from Spain.

As part of objective II the following studies were performed:

- Second research study: Description of an *erm*(B)-carrying *Campylobacter coli* isolate in Europe.
- Third research study: Erythromycin resistance gene *erm*(B) in *Campylobacter* isolates from turkeys and identification of possible bacterial species involved in its horizontal transmission.

**5.3 Objective III: Genomic characterization and antimicrobial resistance genes in *Campylobacter* isolates from humans, food animals and wastewater.**

This study arises from the interest of comparing the genetic diversity in multiresistance genomic islands present in *Campylobacter* isolates from humans, food animals and wastewater, in order to identify possible relations between the isolates, their transfer mechanisms of resistance (genomic islands) and the determinants of resistance.

Thus, within this objective the following study was carried out:

- Fourth research study: Genomic characterization and resistance of *C. jejuni* and *C. coli* isolated from humans, animals and wastewater.

## **6. TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN**



### 6.1 Polimorfismo genómico, genes de virulencia y perfiles metabólicos de *Campylobacter jejuni* ST-45 aislados de pollos.

*Campylobacter* utiliza aminoácidos como sustrato nutricional debido a su incapacidad para metabolizar azúcares (24, 175). Estos microorganismos pueden metabolizar aminoácidos como serina, prolina, aspartato y glutamato pero sólo algunos aislados tienen la capacidad de metabolizar glutamina, asparagina y/o monosacáridos como L-fucosa (27, 28, 41, 176, 177). Los aislados de *C. jejuni* que porten los genes que les permitan metabolizar estas moléculas tendrán ventajas frente al resto por lo que son consideradas factores potenciales de colonización (27, 47). En diferentes países de la UE se ha observado una distribución de STs *C. jejuni* en personas y animales similar a la de nuestro estudio, siendo el ST-21, el ST-45 y el ST-257 los más frecuentemente aislados (178, 179). La presencia de estos factores de colonización podría explicar por qué algunos STs están más distribuidos que otros y ayudaría por tanto a comprender la estructura poblacional de *Campylobacter*.

El enzima  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa (GGT) es considerado uno de los principales factores de virulencia en otros patógenos intestinales como *Helicobacter pylori* (180, 181). Para identificar aislados capaces de metabolizar el aminoácido glutamina, se identificó el gen  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa (*ggt*) por PCR (reacción en cadena de la polimerasa o *Polymerase Chain Reaction*) en una colección de *C. jejuni* (n=176) aislados de pollos. Los aislados de *C. jejuni* incluidos en este estudio se obtuvieron a partir de muestras de pollos recogidas entre 2007-2012 en diferentes mataderos del Reino Unido. Los aislados seleccionados pertenecen a los CCs ampliamente diseminados (64, 68), ST-21 (n=23), ST-45 (n=68) y ST-257 (n=85). Tras la identificación del gen *ggt*, se seleccionaron los aislados de *C. jejuni* positivos al gen y se confirmó su expresión por técnicas bioquímicas.

El gen *ggt* se identificó en 37 aislados de *C. jejuni* de los cuáles 36 pertenecieron al ST-45 (97%) y 1 al ST-257 (3%). Las pruebas bioquímicas confirmaron que todos los *C. jejuni* *ggt*+ expresaron el enzima GGT (37/37; 100%). Con el objetivo de conocer la diversidad de perfiles metabólicos presentes y hacer estudios filogenéticos, se secuenció el genoma completo de un grupo de aislados de *C. jejuni* ST-45, positivos y negativos al gen *ggt*, seleccionados aleatoriamente en

los dos grupos (8 *ggt*+ y 6 *ggt*-). Se identificaron los genes de colonización *ansB(s)* (12/14; 86%), *fucP* (1/14; 7%) y *dmsA* (11/14; 79%). De acuerdo con el estudio filogenético, basado en los genomas completos, y los genes de colonización, los 14 aislados de *C. jejuni* ST-45 se clasificaron en siete grupos pertenecientes a cinco perfiles de genes metabólicos diferentes.

Este estudio pone de manifiesto la mayor frecuencia de detección de *ggt* en *C. jejuni* ST-45 ( $p < 0,05$ ), en comparación con la presencia de *ggt* en otros STs de nuestro estudio. Los resultados indican también que existe una gran diversidad de *C. jejuni* (7 grupos en 14 aislados). La asociación entre ciertos factores de colonización y el complejo clonal podría explicar la capacidad que tienen ciertos aislados para colonizar nuevos nichos.

## Genomic polymorphism, virulence genes and metabolic profiles in *Campylobacter jejuni* ST-45 isolated from poultry.

### Summary

*Campylobacter* spp. is the major cause of foodborne diarrhea for humans. Campylobacteriosis is mainly caused by strains of *C. jejuni* species, followed by *C. coli*. The main reservoir of *Campylobacter* isolates is the intestinal mucosa of mammals and birds, among which poultry is a main food stock. Since *Campylobacter* spp. cannot metabolize sugars, C is assimilated from amino acids like glutamine, although it can only be used by strains carrying the  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase (*ggt*) gene that is therefore considered a colonization factor. This study was carried out in a collection of *C. jejuni* strains (n=176) isolated from poultry that belonged to three different sequence types (ST-45, n=68; ST-21, n=23 and ST-257, n=85). Among them, the *ggt* gene was identified in 37 isolates of *C. jejuni* ST-45 more one ST-257. With the aim of analyse metabolic differences between *ggt*+ and *ggt*- isolates, fourteen ST-45 *C. jejuni* isolates, eight carrying the *ggt* gene and six lacking it, were selected for genome-scale analysis including SNP typing and detection of colonization factors *ansB*(s), *fucP* and *dmsA*. Thus, ST-45 *C. jejuni* strains were classified in seven groups, including five metabolic profiles, with the potential to predict their impact on public health.

### Introduction

Campylobacteriosis is known as the most common gastro-enteric infection in humans, with 229,213 confirmed cases in the EU in 2015 (1). The UK is the second country with the highest number of confirmed cases of campylobacteriosis in 2015, being the first Germany, with an annual cost of more than £550 million to the economy (1, 2). The intestinal microbiota of poultry is the primary reservoir for *Campylobacter* spp. (1), although it is also present in pigs, sheep and cattle, including food products of animal origin such as milk (3-5) and, due to the presence of faecal matter in the environment, it has also been found in untreated surface water (6). *Campylobacter jejuni* is the main species associated with human infections in industrialized countries (7). The enteritis caused by *C. jejuni* is usually a self-limiting illness, but in some cases the infection can lead to a neurological complication known as Guillain-Barre Syndrome (7).



Multi-locus sequence typing (MLST) is currently the reference method to characterize the *Campylobacter* population structure (26). The MLST data from different European countries have shown that strains from clonal complexes (CC) CC-45 and CC-21 are commonly isolated from animal, human and environmental samples (8, 9). On the other hand, it is known that other CCs in *C. jejuni* are host-associated as CC-61 and CC-257 from cattle and poultry, respectively (10), although *C. jejuni* CC-257 is also present in humans and swine ([www.pubmlst.org/campylobacter](http://www.pubmlst.org/campylobacter)).

*C. jejuni* cannot metabolize most sugars because of the absence of the glycolytic enzyme phosphofructokinase, therefore amino acids are used as preferred substrates for bacterial nutrition (11, 12). *C. jejuni* is able to metabolize amino acids as serine, proline, aspartate and glutamic acid but the ability to metabolize glutamine or asparagine only occurs in some strains (13-16). Glutamine is the main amino acid in the human blood serum, playing important roles for C and N transport and metabolism among tissues (17), although it only can be used by *C. jejuni* strains carrying the  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase (*ggt*) gene (13). Presence of the *ggt* gene has been associated to bloody diarrhea and, therefore, it is considered as a marker of virulence for *Campylobacter* strains (18). The enzyme  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase (GGT) is considered one of the main virulence factors in other intestinal pathogens such as *Helicobacter pylori*.

The metabolic potential of *Campylobacter* isolates could be also expanded by the expression of other colonization genes as *ansB*, encoding a secreted L-asparaginase; *fucP*, a fucose permease; *cj1585c* and *cjj81176-1367/1371*, with coding sequences for an oxidoreductase and a serine protease, respectively (13, 19). Prevalence of the *ggt* gene varies between 8 and 30% according to the clonal complex (CC) composition of the analyzed *C. jejuni* collections (20, 21). In this study, presence and expression of the GGT enzyme in *C. jejuni* isolates from poultry was evaluated, including its association to STs linked to infection in humans (ST-45, ST-21 and ST-257). Finally, whole genome sequencing in a selection of *ggt*<sup>+</sup> and *ggt*<sup>-</sup> *C. jejuni* isolates allowed the typing of strains into seven groups, including five different metabolic profiles.

## Material and methods

### Bacterial strains, culture and DNA extractions.

The *Campylobacter* isolates included in this study (n=176) were obtained from poultry samples collected in a dispersed range of slaughterhouses across the United Kingdom between 2007 and 2012. The isolates were selected according to the ST: ST-45 (n=68), ST-21 (n=23) and ST-257 (n=85). *C. jejuni* isolates were stored at -80°C in 1% protease peptone and 10% glycerol broth. Strains were recovered by subculturing on SBAA (7% sheep blood agar; 0.01% Actidione) and isolated on selective solid medium, modified charcoal cefoperazone deoxycholate agar (mCCDA). Incubation was performed at  $41.5 \pm 1$  °C under microaerobic conditions. The DNA extraction was made by taking growth (10 µl loopful) into 700 µl distilled water and vortexing to give a suspension. Following, it was placed in a boiling water bath for 10 min, centrifuged for 3 min at 13000 rpm and the supernatant was stored at 4°C.

### Detection of *ggt* gene and activity of the enzyme GGT.

The detection of the *ggt* gene was performed by PCR with the following primers *ggtFW* (5'-GAGTGCTATGCTTGATCGCT-3') and *ggtRV* (5'-TAGGTGGCGACATGGAAATG-3') as previously described (22). Cycling conditions were one cycle of 94 °C for 5 min, followed by 30 cycles of 94 °C for 30 s, 58 °C for 30 s and 72 °C for 30 s and finally one cycle of 72 °C for 5 min. All *ggt* + *C. jejuni* isolates were further analysed for the expression of *ggt* gene. The first step was mixing fresh growth (one 10 µl loopful) from a non-selective agar plate into 100 µL of reagent containing 50 mM Tris (pH 8.25), 1.5 mM L-glutamyl-carboxyl-3 nitro-4 anilide and 50 mM glycylglycine. After 1h at 37°C, samples from strains expressing GGT activity turned out yellow (18).

### Whole genome sequencing, phylogeny and gene factor analysis.

In order to evaluate the presence of other colonization factors associated or not with *ggt* gene, 14 DNA extractions from ST-45 *C. jejuni* isolates (8 *ggt*<sup>+</sup> and 6 *ggt*<sup>-</sup>) were sequenced (**Table 1**). The presence of the following colonization genes has been studied: *ansB(s)* (L-asparaginase with secretion signal sequence), *fucP* (fucose permease), *dmsA* (subunit of the putative tripartite anaerobic dimethyl sulfoxide oxidoreductase), *cji81176-1367/1371* (serine protease) and *cj1585c* (oxidoreductase) (19). The DNA extraction was carried out by GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Life Technologies, USA). Genomic

DNA was fragmented and tagged for multiplexing with Nextera XT DNA Sample Preparations Kits (Illumina) and sequenced using the Illumina GAII platform with 150 bp paired-end reads. Raw data were aligned to the *C. jejuni* strain 4031 which belongs to ST-45. The quality of the paired-end samples were asserted using FASTQC software (Babraham Institute). Replicated paired-end reads were filtered out leaving a single copy. The remaining reads were trimmed (Trimmomatic, The USADEL Lab) on the right end using a sliding window of length 10bp and a quality threshold of 20. The minimum allowed length after trimming was 35bp. The paired-end reads were mapped onto the *C. jejuni* strain 4031 (ST-45) using SMALT (Sanger Institute). The resulting SAM files were transformed into BAM format and sorted. Then, variant calling format (VCF) files were generated (SAMtools).

The SNPs against the reference strain were extracted from the VCF files applying 3 quality control criteria; firstly, the quality of the variant call has to be greater than 150 (from a range of 0-222), secondly the number of forward and reverse reads in agreement with the variant call has to be greater than 2 in both cases and lastly, the proportions of forward and reverse reads in agreement with the variant call has to be more than 80% of the total forward and reverse reads covering the site. The SNPs for all the strains were combined in a matrix where the rows and columns correspond to the informative sites and strains respectively. Rows containing a non-call for any of the strains were filtered out. Additionally, informative sites within a repeated region in the genome were also filtered out. The phylogeny was generated using the maximum parsimony algorithm implemented using MEGA software. A total of 500 bootstrap iterations were carried out. All the nodes showed more than 95% bootstrap agreement.

To detect the presence or absence of the gene factors a FASTA file with the sequence of genes *ggt*, *fucP*, *dmsA*, *ansB*, *Cj1585c* and *cjj81176-1367/1371* as used as reference. Following the same procedure as described above, the raw data sets were mapped against the reference. A gene was considered present if the percentage of the gene covered was greater than 99% with a mean coverage value greater 20.

## Results

### Prevalence of *ggt* gene.

The presence of the *ggt* gene was investigated in a collection of 176 *C. jejuni* isolates from poultry belonging to three different STs. Thirty-seven *C. jejuni* isolates were positive to *ggt* gene of which thirty-six belonged to the ST-45 and only one to ST-257. The presence of *ggt* gene in the ST-45 *C. jejuni* was 52.94% (36/68). In the ST-257 strains, only one was *ggt* positive (1/85; 1.17%) and the gene was not detected in any of the ST-21 strains. All the *C. jejuni* isolates carrying the *ggt* gene showed a positive reaction in the GGT activity test, with exception of three negative controls randomly selected.

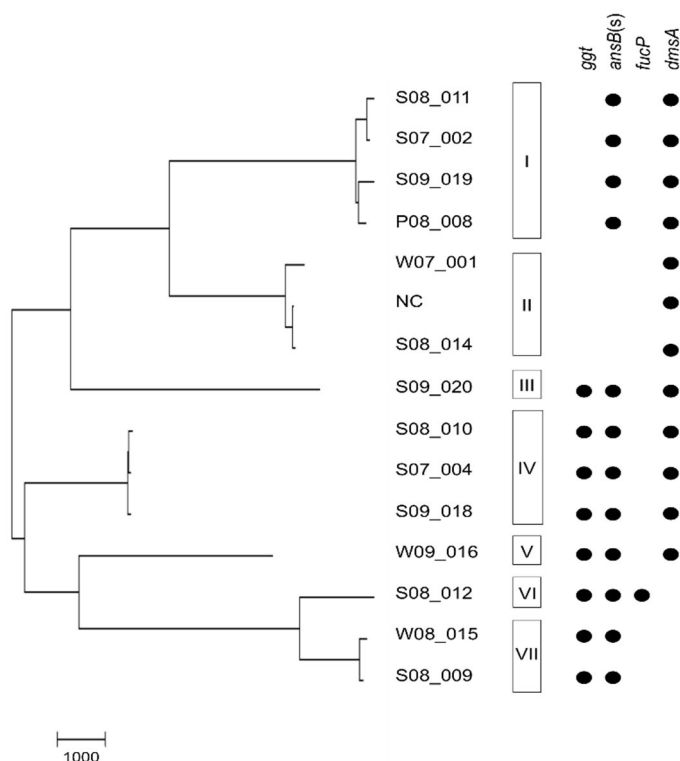
### Distribution of colonization genes and phylogenetic analysis.

In order to make a phylogenetic analysis and to know the distribution of other colonization factors, 14 *C. jejuni* ST-45 isolates were selected (8 *C. jejuni* *ggt*<sup>+</sup> and 6 *C. jejuni* *ggt*<sup>-</sup>) to sequence their entire genome (**Table 1**). The colonization genes identified in the *C. jejuni* isolates were *ansB(s)*, *fucP* and *dmsA*. The genetic markers *cj1176-1367/1371* (serine protease) and *cj1585c* (oxidoreductase) have not been identified in any of the *C. jejuni* ST-45 isolates of this study. The presence of the *ansB(s)* gene was 86% (12/14), *fucP* 7% (1/14) and *dmsA* 79% (11/14). The isolates W07\_001 and S08\_014 lacking the gene *ansB(s)* were also negative to the rest of the genetic markers except for *dmsA* gene. The *fucP* gene was only present in the isolate S08\_012 (11).

**Table 1.** Epidemiological data from the *C. jejuni* strains used

| Strain  | Season | Year | Slaughterhouse | <i>ggt</i> |
|---------|--------|------|----------------|------------|
| W08_015 | Winter | 2008 | F              | +          |
| S08_012 | Summer | 2008 | I              | +          |
| S09_020 | Summer | 2009 | M              | +          |
| S08_009 | Summer | 2008 | C              | +          |
| W09_016 | Winter | 2009 | D              | +          |
| S09_018 | Summer | 2009 | G              | +          |
| S08_010 | Summer | 2008 | C              | +          |
| S07_004 | Summer | 2007 | L              | +          |
| S09_019 | Summer | 2009 | B              | -          |
| S08_011 | Summer | 2009 | E              | -          |
| S07_002 | Summer | 2007 | E              | -          |
| P08_008 | Spring | 2008 | F              | -          |
| W07_001 | Winter | 2008 | F              | -          |
| S08_014 | Summer | 2008 | C              | -          |

According to the SNPs and colonization factors identified *C. jejuni* isolates ST-45 could be divided in seven groups belonging to five metabolic profiles. The phylogeny for the 14 strains sequenced and the associated colonization factors are shown in Figure 1. *C. jejuni* strains associated to factors *ggt* (III-VII), *ansB* (I and III-VII), *fucP* (VI) and *dmsA* (I-V) form lineages well differentiated from the rest by a considerable number of SNPs (**Figure 1**).



**Figure 1.** Phylogenetic tree of *C. jejuni* ST-45 *ggt*<sup>+</sup>/*ggt*<sup>-</sup> and metabolic profiles. White boxes represent the different metabolic profiles identified (I-VII) according to the genetic markers identified. A black circle represents the genetic markers present in each *C. jejuni* isolate. NC: Strain used as reference. Scale bar represent the number of nucleotide substitutions per site. The genetic markers *cjj81176-1367/1371* (serine protease) and *cj1585c* (oxidoreductase) have not been included because they have been absent in all isolates analysed.

## Discussion

Research on the colonization factors of *Campylobacter*, as those analysed in this study, is relevant to understand the ecology of this organism. Indeed, some colonization factors as *ggt* are related with the sequence type (21, 23). In order to better understand the role of *ggt* gene in *Campylobacter*, we evaluated the presence of this genetic marker in a collection of *C. jejuni* from three STs: ST-21, ST-45 and ST-257. Through genetic characterization by MLST, the animal origin of bacteria producing campylobacteriosis in several countries has been estimated

(24-26). The human related *C. jejuni* ST-21 and ST-45 have been isolated also from raw chicken, several hosts (poultry, ducks and dogs) and water (6, 27-29). Instead, the ST-257 is mainly associated with *C. jejuni* isolated from poultry (30). There are several factors that can make a lineage able to grow successfully in different hosts as: (i) modify gene expression in different environments, (ii) DNA mutations or (iii) import genes from already adapted strains (31). At the third case, some genetic markers could improve the colonization at different environments or hosts (32).

The *ggt* gene was present in thirty-seven out of one hundred seventy-six *C. jejuni* isolated from poultry between 2007 and 2009. More than 98% of the isolates were *C. jejuni* ST-45 while 2.7% (one single isolate) belonged to the ST-257 and any to ST-21. Our results are in line with others where the *ggt* gene are present in *C. jejuni* CC-45 but it is lacking in *C. jejuni* CC-21 or CC-257 (23), confirming the association of *ggt* gene with the founder of the CC-45. As it has been published, the genetic markers associated with ST-21 are *cjj1367*, *cj1585* and *dtlp7*. *C. jejuni* ST-257 is associated with *dmsA*, *ansB(s)* and *cjj1367* (23).

A collection of ST-45 *C. jejuni* strains, 8 *ggt* positives and 6 *ggt* negatives, were selected for WGS in order to evaluate the phylogenetic relationships between *ggt* and other factors of colonization. Besides gene *ggt*, three other genetic markers have been identified as colonization factors: *ansB(s)*, *fucP* and *dmsA*. Previous studies described the presence of marker genes in different clonal complex, being *ggt*, *ansB(s)* and *dmsA* genes related to CC-45, whereas *fucP* was found mainly associated to *C. jejuni* CC-21 isolated from bovine, *C. jejuni* CC-21 from humans and *C. jejuni* CC-45 from environmental samples and, to a lesser extent, in isolates from humans (21, 23). Therefore, the finding in our study of *fucP* in a *C. jejuni* ST-45 from poultry is a novelty that must be considered in order to better understanding the epidemiology of colonization factors in *Campylobacter*.

The *C. jejuni* isolates of this study, according to the SNPs and colonization factors identified, have been divided in seven groups (**Figure 1**). According the *ggt* gene, three separate phylogenetic groups were detected. One group is composed of *C. jejuni* ST-45 CC negatives to *ggt* (I-II) and contains *ansB(s)* and *dmsA* as colonization factors. Phylogeny and gene-marker profiling reveals that S09\_020 belongs to a second group (III characterized by carrying *ansB(s)*, *dmsA* and *ggt*

genes. All *C. jejuni* isolates from the third group carried the *ggt* gene and different combinations of gene markers: *ggt*, *asnB*(s) and *dmsA* (IV-V), *ggt*, *ansB*(s) and *fucP* (VI) and *ggt* more *ansB*(s) (VII). The gene *ansB*(s) is present in all of the isolates except in the clade II. On the other hand the *dmsA* gene was present in all *C. jejuni* apart from the clade VI and VII. Although the sample size of this study might not be large enough to be considered fully representative, the clustering observed suggests that acquisition or loss of gene factors occurred at a unique time during the *C. jejuni* evolution producing the different metabolic profiles that are currently observed.

The findings of this work suggest that *ggt* gene is common in ST-45 isolates from United Kingdom poultry but not so in ST-21 or ST-257, which highlight the usefulness of the MLST to characterize populations of *C. jejuni*. In conclusion, the results of this study suggest a great diversity of *C. jejuni* colonization factors in the sequence type ST-45. Since colonization factors could contribute the ability to colonize biological niches, this study might contribute to a better understand of the ecology of *Campylobacter* and therefore represents a further step towards controlling its impact on public health.

## References

1. EFSA, The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. EFSA Journal, 2016. 14(12): p. 231.
2. Strachan, N.J. and K.J. Forbes, The growing UK epidemic of human campylobacteriosis. Lancet, 2010. 376(9742): p. 665-7.
3. Skirrow, M.B., John McFadyean and the centenary of the first isolation of *Campylobacter* species. Clin Infect Dis, 2006. 43(9): p. 1213-7.
4. Silva, J., et al., *Campylobacter* spp. as a Foodborne Pathogen: A Review. Front Microbiol, 2011. 2: p. 200.
5. Epps, S.V., et al., Foodborne *Campylobacter*: infections, metabolism, pathogenesis and reservoirs. Int J Environ Res Public Health, 2013. 10(12): p. 6292-304.
6. Ugarte-Ruiz, M., et al., Method comparison for enhanced recovery, isolation and qualitative detection of *C. jejuni* and *C. coli* from wastewater effluent samples. Int J Environ Res Public Health, 2015. 12(3): p. 2749-64.
7. Allos, B.M., *Campylobacter jejuni* Infections: update on emerging issues and trends. Clin Infect Dis, 2001. 32(8): p. 1201-6.



8. Sheppard, S.K., et al., *Campylobacter* genotyping to determine the source of human infection. Clin Infect Dis, 2009. 48(8): p. 1072-8.
9. Manning, G., et al., Multilocus sequence typing for comparison of veterinary and human isolates of *Campylobacter jejuni*. Appl Environ Microbiol, 2003. 69(11): p. 6370-9.
10. Sheppard, S.K., et al., Niche segregation and genetic structure of *Campylobacter jejuni* populations from wild and agricultural host species. Mol Ecol, 2011. 20(16): p. 3484-90.
11. Velayudhan, J. and D.J. Kelly, Analysis of gluconeogenic and anaplerotic enzymes in *Campylobacter jejuni*: an essential role for phosphoenolpyruvate carboxykinase. Microbiology, 2002. 148(Pt 3): p. 685-94.
12. Lee, M.D. and D.G. Newell, *Campylobacter* in poultry: filling an ecological niche. Avian Dis, 2006. 50(1): p. 1-9.
13. Hofreuter, D., V. Novik, and J.E. Galan, Metabolic diversity in *Campylobacter jejuni* enhances specific tissue colonization. Cell Host Microbe, 2008. 4(5): p. 425-33.
14. Leach, S., P. Harvey, and R. Wali, Changes with growth rate in the membrane lipid composition of and amino acid utilization by continuous cultures of *Campylobacter jejuni*. J Appl Microbiol, 1997. 82(5): p. 631-40.
15. Hepworth, P.J., et al., Genomic variations define divergence of water/wildlife-associated *Campylobacter jejuni* niche specialists from common clonal complexes. Environ Microbiol, 2011. 13(6): p. 1549-60.
16. Stahl, M., et al., L-fucose utilization provides *Campylobacter jejuni* with a competitive advantage. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. 108(17): p. 7194-9.
17. Taylor, L. and N.P. Curthoys, Glutamine metabolism: Role in acid-base balance\*. Biochem Mol Biol Educ, 2004. 32(5): p. 291-304.
18. Feodoroff, B., et al., *Campylobacter jejuni* isolates in Finnish patients differ according to the origin of infection. Gut Pathog, 2010. 2(1): p. 22.
19. Gonzalez, M., et al., Bovine *Campylobacter jejuni* strains differ from human and chicken strains in an analysis of certain molecular genetic markers. Appl Environ Microbiol, 2009. 75(4): p. 1208-10.
20. Revez, J., et al., Finnish *Campylobacter jejuni* strains of multilocus sequence type ST-22 complex have two lineages with different characteristics. PLoS One, 2011. 6(10): p. e26880.
21. de Haan, C.P., et al., Association of *Campylobacter jejuni* metabolic traits with multilocus sequence types. Appl Environ Microbiol, 2012. 78(16): p. 5550-4.
22. Gonzalez-Hein, G., et al., Prevalence of virulence genes in strains of *Campylobacter jejuni* isolated from human, bovine and broiler. Braz J Microbiol, 2013. 44(4): p. 1223-9.
23. Zautner, A.E., et al., Epidemiological association of different *Campylobacter jejuni* groups with metabolism-associated genetic markers. Appl Environ Microbiol, 2011. 77(7): p. 2359-65.

24. Cody, A.J., et al., A longitudinal 6-year study of the molecular epidemiology of clinical campylobacter isolates in Oxfordshire, United kingdom. *J Clin Microbiol*, 2012. 50(10): p. 3193-201.
25. Kittl, S., et al., Comparison of genotypes and antibiotic resistance of *Campylobacter jejuni* isolated from humans and slaughtered chickens in Switzerland. *J Appl Microbiol*, 2011. 110(2): p. 513-520.
26. Sheppard, S.K., et al., *Campylobacter* genotypes from food animals, environmental sources and clinical disease in Scotland 2005/6. *Int J Food Microbiol*, 2009. 134(1-2): p. 96-103.
27. Llarena, A.K., et al., Predominant *Campylobacter jejuni* sequence types persist in Finnish chicken production. *PLoS One*, 2015. 10(2): p. e0116585.
28. Wei, B., et al., Antimicrobial susceptibility profiles and molecular typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from ducks in South Korea. *Appl Environ Microbiol*, 2014. 80(24): p. 7604-10.
29. Holmberg, M., et al., Prevalence of thermophilic *Campylobacter* species in Swedish dogs and characterization of *C. jejuni* isolates. *Acta Vet Scand*, 2015. 57: p. 19.
30. Habib, I., et al., Clonal population structure and antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* in chicken meat from Belgium. *Appl Environ Microbiol*, 2009. 75(13): p. 4264-72.
31. Johnsborg, O., V. Eldholm, and L.S. Havarstein, Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. *Res Microbiol*, 2007. 158(10): p. 767-78.
32. Hofreuter, D., et al., Unique features of a highly pathogenic *Campylobacter jejuni* strain. *Infect Immun*, 2006. 74(8): p. 4694-707.

## 6.2 Primera descripción del gen *erm*(B) en un *Campylobacter coli* de Europa.

En el año 2014 se identificó en aislados de *C. coli* procedentes de China un mecanismo de resistencia a eritromicina no descrito antes en esta especie. Este mecanismo de resistencia está constituido por el gen *erm*(B) que codifica una metilasa que actúa sobre el ribosoma impidiendo la unión con el antibiótico y generando altos niveles de resistencia a eritromicina (127). El gen *erm*(B) es el primer mecanismo de resistencia a macrólidos identificado en *Campylobacter* con capacidad de transferirse a otras bacterias horizontalmente mediante islas genómicas de multirresistencia (127, 150). Se ha publicado la presencia de este gen en *C. coli* aislados de personas y animales de abasto así como en *C. jejuni* de pollos, pero todos los casos procedentes de China (150, 172).

Este trabajo se desarrolló con el objetivo de caracterizar la resistencia a macrólidos en aislados de *Campylobacter* procedentes de España y de identificar la presencia del gen *erm*(B) en Europa. Para el desarrollo de este estudio se partió de una colección de 88 aislados de *Campylobacter* procedentes de animales de abasto (pollos: n=29; cerdos: n=34; vacas: n=11) y de aguas residuales (n=14) siendo todos ellos altamente resistentes a eritromicina (MIC > 16 mg/L).

Siguiendo la técnica de dilución en agar se aumentó el rango de concentración de eritromicina (0,25 – 1024 mg/L) con el objetivo de medir el nivel de resistencia real de cada aislado. Los aislados con mayor nivel de resistencia (MIC > 512 mg/L) se seleccionaron para detectar la presencia del gen *erm*(B) así como otros mecanismos de resistencia a eritromicina (mutaciones en el gen 23S, modificaciones en las proteínas ribosomales L4 y L22) y evaluar el efecto inhibitorio de las bombas de eflujo. Para identificar la localización y el entorno genético del gen *erm*(B), se utilizó la técnica de secuenciación masiva.

De los 88 aislados de *Campylobacter*, 5 revelaron un nivel de resistencia a eritromicina mayor (MIC > 512 mg/L) y todos ellos fueron *C. coli* procedentes de pollos. Un aislado, concretamente la cepa ZTA09/02204, resultó ser positivo al gen *erm*(B) y no presentó otros mecanismos de resistencia a eritromicina conocidos.

El gen *erm*(B) identificado en *C. coli* ZTA09/02204 mostró un 100% de similitud con su ortólogo en otras especies bacterianas como *Enterococcus faecium*, *Clostridium difficile* y *Streptococcus suis*. El gen *erm*(B) se localizó en el cromosoma, concretamente en una isla genómica de 11.769 pares de bases en la que se encontraban otros genes de resistencia a aminoglucósidos y tetraciclina. Según la organización de los genes y su localización en el cromosoma, parece ser un tipo de isla genómica diferente a las identificadas en *Campylobacter* de China.

El presente trabajo de investigación se muestra tal y como se ha publicado en la revista *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (151).

### Description of an *erm*(B)-carrying *Campylobacter coli* isolate in Europe

*C. jejuni* and *C. coli* are the principal cause of foodborne zoonoses in humans. Campylobacteriosis is caused by *C. jejuni* and *C. coli*, and the infection is produced by ingesting contaminated food. The main reservoir is the intestinal microbiota of birds, especially poultry. Although the treatment for campylobacteriosis is generally oral rehydration therapy; the drugs of choice are macrolides, such as erythromycin (1). Thus, macrolide resistance poses a serious public health threat.

Bacteria carrying the *erm*(B) gene are resistant to macrolides, lincosamides and streptogramin B (MLS<sub>B</sub> phenotype) via methylation of the 23S rRNA gene (2, 3). The *erm*(B) gene has been described in highly erythromycin-resistant *Campylobacter* isolates in China, located in an MDR genomic island (MDRGI). Transference to erythromycin-susceptible *C. jejuni* by transformation has been observed (2, 3). The aims of our study were to detect *erm*(B) in erythromycin-resistant isolates of our collection and to compare these findings with the presence of other known mechanisms of erythromycin resistance (target mutations of the 23S rRNA gene and ribosomal proteins L4 and L22, and antibiotic efflux pumps).

Of 555 isolates obtained from food animals in Spain during 2008-11, 74 isolates with an erythromycin MIC  $\geq 32$  mg/L (broth microdilution by UNE-EN ISO20776-1) were randomly selected (broiler: n=29; fattening pigs: n=34; young cattle: n=11) (4). Additionally, 14 *Campylobacter* isolates from urban effluents (MIC  $\geq 32$  mg/L) were also selected (5). Isolates were not epidemiologically related.

Agar dilution susceptibility testing (CLSI methodology) was performed to increase the antimicrobial range (0.25-1024 mg/L). The assay was carried out using Mueller-Hinton w agar supplemented with erythromycin and 5% lysed horse blood. Isolates with the highest level of resistance (MIC  $\geq 1024$  mg/L) were tested to detect the *erm*(B) gene as well as target mutations in the 23S gene, target modifications in ribosomal proteins L4 and L22 and the effect of PAbN as an efflux pump inhibitor (6-9). WGS (Ion Torrent PGM) was performed to determine the location of the methylase gene *erm*(B) and its genetic environment. Raw data

were aligned to *C. coli* RM 4661 (NZ\_CP007181) using CLC Genomics Workbench 7.5.1. The BLAST application was used to study similarities.

Five isolates of 88 revealed a high level of resistance to erythromycin (MIC  $\geq 1024$  mg/L), all them *C. coli* isolated from broilers. Only the *C. coli* ZTA09/02204 isolate was positive for the *erm*(B) gene; additional erythromycin-resistance mechanisms were not detected. The *C. coli* ZTA09/02204 isolate presented resistance to nalidixic acid, ciprofloxacin, tetracycline and streptomycin, and was susceptible to gentamicin (data not shown). The MLS<sub>B</sub> phenotype could not be confirmed, as lincosamide and streptogramin B were not included in our panel.

No effect of PAbN was observed on the MIC for isolate ZTA09/02204, which suggests that the active efflux mediated by CmeABC makes no contribution to the phenotype. Although overexpression of *cmeABC* could have led to the results, previous studies describe no synergy between methylase *erm*(B) gene and efflux pumps (10).

The *erm*(B) gene is 738 bp and shows 100% nucleotide identity to *erm*(B) of *Enterococcus faecium* e389 (JN899587), *Clostridium difficile* 200785596 (FN665654) and *Streptococcus suis* 2-22 (EU047808). When the *erm*(B) gene from this study is compared with the *erm*(B) gene described in *Campylobacter*, the nucleotide identify is 99% (G299A). The *erm*(B) gene is located in the chromosome of *C. coli* ZTA09/02204 within a gene cluster with other antimicrobial resistance genes constituting an MDRGI (**Figure 1**) (2).

The MDRGI (GenBank accession no. KT953380) is 11769 bp, and it was inserted in one hypothetical protein (YSS\_00750 gene). The average guanine and cytosine content is 38.5%, higher than the guanine and cytosine content in the genome (31.1%). The MDRGI contains 12 ORFs, five of them antibiotic resistance genes (**Table S1**). The MDRGI of *C. coli* ZTA09/02204 seems to be a new type, as the organization of genes and its location in the chromosome differ from those in other types (2, 3). Therefore, the MDRGI of this study might be designated type VIII. When the MDRGI *C. coli* ZTA09/02204 is compared with those already described, its similarity is higher to types V, VI and VII, as they present a complete *tet*(O) coding regions (2, 3). However, our isolate contains a

full-length pnp gene, in contrast to the truncated forms carried by types V to VII (**Figure 1**).

The different structures of the ZTA09/02204 MDRGI and the MDRGI previously published likely reflect a different origin. According to the guanine and cytosine percent content, the MDRGI have been divided into three different regions (**Figure 1** and **Table S1**). Region B had 99% identity with *Eggerthella* sp. YY918 (AP012211) and *Bacteroides uniformis* WH207 (AY345595). Regions A and C presented 99% identity with plasmid pN29710-1 from *C. coli* CVM N29710 (CP004067) (**Figure 1**), which would suggest a plasmid as the insertion vehicle of the *erm*(B) gene in the chromosome. Moreover, *Eggerthella* and *B. uniformis* belong to the intestinal microbiota (11), so they could coexist with *Campylobacter*, favouring the DNA exchange.

To our knowledge, this is the first description of the methylase gene *erm*(B) in *Campylobacter* in Europe. The presence of the *erm*(B) gene associated with an MDRGI would highlight the potential horizontal transfer of this resistance mechanism.

**Figure 1.** Comparative genetic organization of the *C. coli* ZTA09/02204 and previously identified *Eggerthella* sp. YY918, *B. uniformis* WH207, *C. coli* SH-CCD11C365 and *C. coli* CVM N29710 as possible origins of the MDRGI of this study. The *erm*(B) gene is shown in red, aminoglycoside resistance genes are shown in yellow, the tetracycline resistance gene *tet*(O) is shown in purple, genes with predicted functions are shown in green and genes encoding hypothetical proteins are shown in white. The border gene is shown in black. The grey shading indicates regions sharing >98% DNA identity. GC, guanine and cytosine content. The structure scheme of MDRGI of *C. coli* SH-CCD11C365 is based on Figure 1 in Wang *et al* (2). This figure appears in colour in the online version of JAC and in black and white in the print version of JAC.



**Table S1.** Multidrug resistant genomic island of ZTA09/02204

| Gene<br>or ORF | Length (amino acids)      |                                    | Amino Acid<br>Identity (%) | Annotation/Blast hit  |
|----------------|---------------------------|------------------------------------|----------------------------|---|
|                | Protein in<br>ZTA09/02204 | Homologous<br>Protein <sup>a</sup> |                            |   |
| <i>tet(O)</i>  | 639                       | 639                                | 637/639 (99)               | Tetracycline resistance protein TetO [ <i>Campylobacter coli</i> ] / CDL89132       |
| <i>pnp</i>     | 256                       | 256                                | 256/256 (100)              | Phosphorylase family [ <i>Clostridium difficile</i> ] / EFH06514                    |
| <i>aad9</i>    | 218                       | 218                                | 218/218 (100)              | Streptomycin 3"-adenylyltransferase [ <i>Campylobacter coli</i> ] / AGV10824        |
| <i>orf 4</i>   | 292                       | 292                                | 292/292 (100)              | Hypothetical protein HMPREF1063_03418 [ <i>Bacteroides dorei</i> ] / E1Y23031       |
| <i>erm(B)</i>  | 246                       | 246                                | 246/246 (100)              | Erythromycin resistance protein [ <i>Enterococcus faecalis</i> ] / YP_004032993     |
| <i>orf 6</i>   | 43                        | 72                                 | 43/43 (100)                | Putative conjugative transposon prot [ <i>Streptococcus pneumoniae</i> ] / CDL74083 |
| $\Omega$       | 72                        | 72                                 | 68/69 (99)                 | Omega repress [ <i>Campylobacter coli</i> ] / AGN49052                              |
| $\epsilon$     | 90                        | 90                                 | 90/90 (100)                | Epsilon-antitoxin [ <i>Streptococcus suis</i> ] / YP_003024052                      |
| <i>orf 9</i>   | 127                       | 131                                | 127/127 (100)              | Zeta-toxin, partial [ <i>Bacteroides dorei</i> ] / E1Y23034                         |
| <i>aadE</i>    | 267                       | 288                                | 263/266 (99)               | Aminoglycoside 6-adenylyltransferase [ <i>Clostridium difficile</i> ] / EQJ68980    |
| $\Delta$ tetO  | 346                       | 639                                | 346/346 (100)              | Tetracycline resistance protein TetO [ <i>Campylobacter coli</i> ] / CDL89132       |
| <i>cpx2</i>    | 57                        | 57                                 | 57/57 (100)                | cpx2 [ <i>Campylobacter jejuni subsp. jejuni</i> ] / YP_063447                      |

<sup>a</sup>Homologous protein from the organism listed in the annotation/Blast hit column

## References

1. Ruiz-Palacios GM. The health burden of *Campylobacter* infection and the impact of antimicrobial resistance: playing chicken. Clin Infect Dis. 2007;44(5):701-3.
2. Wang Y, Zhang M, Deng F, Shen Z, Wu C, Zhang J, et al. Emergence of multidrug-resistant *Campylobacter* species isolates with a horizontally acquired rRNA methylase. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(9):5405-12.
3. Deng F, Wang Y, Zhang Y, Shen Z. Characterization of the genetic environment of the ribosomal RNA methylase gene *erm(B)* in *Campylobacter jejuni*. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2015;70(2):613-5.
4. Moreno MA, Dominguez L, Teshager T, Herrero IA, Porrero MC. Antibiotic resistance monitoring: the Spanish programme. The VAV Network. Red de Vigilancia de Resistencias Antibioticas en Bacterias de Origen Veterinario. Int J Antimicrob Agents. 2000;14(4):285-90.
5. Ugarte-Ruiz M, Florez-Cuadrado D, Wassenaar TM, Porrero MC, Dominguez L. Method comparison for enhanced recovery, isolation and qualitative detection of *C. jejuni* and *C. coli* from wastewater effluent samples. Int J Environ Res Public Health. 2015;12(3):2749-64.
6. Chen J, Yu Z, Michel FC, Jr., Wittum T, Morrison M. Development and application of real-time PCR assays for quantification of *erm* genes conferring resistance to macrolides-lincosamides-streptogramin B in livestock manure and manure management systems. Appl Environ Microbiol. 2007;73(14):4407-16.
7. Vacher S, Menard A, Bernard E, Santos A, Megraud F. Detection of mutations associated with macrolide resistance in thermophilic *Campylobacter* spp. by real-time PCR. Microb Drug Resist. 2005;11(1):40-7.
8. Ma L, Shen Z, Naren G, Li H, Xia X, Wu C, et al. Identification of a novel G2073A mutation in 23S rRNA in amphenicol-selected mutants of *Campylobacter jejuni*. PLoS One. 2014;9(4):e94503.
9. Bolton D, Patriarchi A, Fox A, Fanning S. A study of the molecular basis of quinolone and macrolide resistance in a selection of *Campylobacter* isolates from intensive poultry flocks. Food Control. 2013;30:222-6.
10. Ding ZF, Zhang H, Tang W. Methylase genes-mediated erythromycin resistance in *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis in China. Israel J Vet Med. 2012;67:170-9.
11. Queipo-Ortuno MI, Boto-Ordóñez M, Murri M, Gomez-Zumaquero JM, Clemente-Postigo M, Estruch R, et al. Influence of red wine polyphenols and ethanol on the gut microbiota ecology and biochemical biomarkers. Am J Clin Nutr. 2012;95(6):1323-34.

### **6.3 Resistencia a eritromicina en *Campylobacter* aislados de pavos: presencia del gen *erm*(B) e identificación de posibles especies bacterianas involucradas en la transmisión horizontal de este mecanismo de resistencia.**

El consumo de carne de pavo ha aumentado muy rápido en los últimos años, siendo en la actualidad uno de los animales de granja con mayor crecimiento en el consumo por habitante (182). Desde el año 2014, los países de la UE cuya producción de carne de pavo exceda de las 10.000 toneladas anuales, tienen la obligación de monitorizar las resistencias a antimicrobianos en *Campylobacter* aislados de estas aves (136). Según ha informado la EFSA, el porcentaje de *C. coli* aislados de pavos y resistentes a eritromicina ha alcanzado el 43%, superando considerablemente el porcentaje observado en aislados de pollos, porcino o bovino (121, 183, 184).

Este trabajo surge de la necesidad de evaluar la presencia del gen de resistencia a eritromicina *erm*(B) en *Campylobacter* aislados de pavos de engorde. Para la realización de este estudio, se partió de una colección de 177 aislados de *Campylobacter* (133 *C. coli* y 37 *C. jejuni*) de pavos procedentes del programa nacional de vigilancia de resistencia (2014-2015). Una vez evaluada la sensibilidad a los seis antimicrobianos del panel definido por la UE se seleccionaron los aislados resistentes a eritromicina (n=85; 81 *C. coli* y 4 *C. jejuni*).

Mediante PCR se identificaron dos aislados de *C. coli* portadores del gen *erm*(B) y se secuenciaron sus genomas completos para analizar el entorno genético del gen *erm*(B). En ambos casos, el gen *erm*(B) se localizó en islas genómicas junto con otros genes de resistencia a tetraciclina, espectinomicina, estreptomycin, gentamicina y kanamicina. La comparación entre secuencias de *erm*(B) identificadas en Europa y las procedentes de China muestra variaciones alélicas.

Con el objetivo de analizar las variaciones alélicas y conocer mejor las posibles rutas de transmisión y transferencia horizontal de *erm*(B), se compararon 12 secuencias de este gen presentes en *Campylobacter*: tres procedentes de España (pertenecientes a los estudios 2 y 3 de esta tesis doctoral) y nueve procedentes de China. Se identificaron cuatro alelos de *erm*(B) presentes en *Campylobacter* y se comparó cada alelo con secuencias idénticas de *erm*(B) presentes en la base de datos del NCBI. Los resultados sugieren que la presencia del gen *erm*(B) en *Campylobacter* tiene su origen en bacterias grampositivas y los alelos identificados

en este estudio han sido previamente identificados en bacterias patógenas procedentes principalmente de personas y cerdos de Asia y Europa.

La presencia de *erm(B)* en *Campylobacter* aislados de pavos añade este hospedador a los animales de abasto implicados en la dispersión de este gen de resistencia a eritromicina.

A continuación se muestra el tercer trabajo de esta tesis doctoral siguiendo el mismo formato que se ha enviado para su publicación a la revista *Frontiers in Microbiology* (enviado el 23 de agosto, 2017).

## **Erythromycin resistance in *Campylobacter* from turkey: *erm*(B) gene and possible bacterial species involved in the horizontal transmission of this resistance mechanism.**

### **Summary**

Pathogens in the genus *Campylobacter* are the most common cause of food-borne bacterial gastro-enteritis. Campylobacteriosis, caused principally by *Campylobacter jejuni* and *C. coli*, is transmitted to humans by food of animal origin, especially poultry. As for many pathogens, the trend of susceptibility to antibiotics undergoes an alarming decline in *Campylobacter*. The mobilization of the erythromycin resistance gene *erm*(B) compromises erythromycin prescription, the treatment of choice for clinical cases requiring antimicrobial therapy. In this study, resistance to six antimicrobials is evaluated in a collection of 170 *Campylobacter* isolates (133 *C. coli* and 37 *C. jejuni*) from turkeys, a relevant poultry sector where *erm*(B) had not been previously detected. Erythromycin resistant isolates (n=85; 81 *C. coli* and 4 *C. jejuni*) were screened for the presence of the *erm*(B) gene, and 2 positive *C. coli* isolates were found and their genomes sequenced. In both isolates the *erm*(B) gene was clustered with resistance determinants against aminoglycosides plus tetracycline, including *aad9*, *aadE*, *aph*(2'')-IIIa, *aph*(3')-IIIa and *tet*(O) genes. Comparative genomic analysis identified identical *erm*(B) sequences among *Campylobacter* from turkeys, *Streptococcus suis* from pigs and *Enterococcus faecium* and *Clostridium difficile* from humans, a distribution that is consistent with multiple events of horizontal transfer occurring in distant geographical locations among different bacterial species that colonize distinct hosts and that might be closely surveyed to preserve the effectiveness of erythromycin in antimicrobial therapy.

### **Introduction**

The World Health Organization (WHO) has recently published a list of bacteria for which new antibiotic therapies are urgently needed, with *Campylobacter* classified as high priority (1). This is of concern as campylobacteriosis is the most commonly notified bacterial foodborne infection in the European Union (2). The disease is principally caused by *Campylobacter jejuni* and *C. coli* following the ingestion of contaminated food and drink, with consumption of poultry meat recognized as a major risk factor (3, 4). Infection can cause extra intestinal pathologies, such as

reactive arthritis or Guillain-Barré syndrome (5), but it is usually self-limiting. Treatment of severe infection occasionally requires antimicrobial therapy, often with erythromycin (2) and to a lesser extent with gentamicin, the later used occasionally when infection becomes systemic (6). Although fluoroquinolones were commonly used in the past, the rising of resistance among *Campylobacter* isolates makes these antibiotics ineffective.

Erythromycin inhibits protein synthesis by binding to the ribosome and blocking the exit of the nascent peptide chain (7). Erythromycin resistance in bacterial isolates from animals and humans is associated with the presence of *erm* genes (8). The most widely distributed *erm* gene class is *erm*(B), which encodes an rRNA methylase which produces cross-resistance to macrolides, lincosamides and streptogramins B (MLS<sub>B</sub> phenotype) (9). The *erm*(B) encoded enzyme acts on the 23S rRNA gene by methylating an adenine residue that hinders antibiotic binding to the ribosome (8). The *erm*(B) gene is present in a variety of Gram-positive bacteria, including enterococci, streptococci and staphylococci (10). The potential for interspecies horizontal gene transfer (11) has facilitated the emergence of resistance in multiple species including Gram-negative bacteria of the genera *Bacteroides*, *Shigella*, *Escherichia*, *Klebsiella* and recently *Campylobacter* (12-15). Resistance in *Campylobacter* has been associated with ribosomal mutations, efflux pumps and the *erm*(B) gene has been identified in isolates from China and Spain (7,15,16). Recent work has reported high-level erythromycin resistance (MIC≥1024 mg/L) in a *C. coli* isolate carrying *erm*(B) in a genomic island along with other determinants conferring resistance to aminoglycosides, tetracycline and streptothricin (16). Thus, eight types of *erm*(B)-carrying genomic islands have been differentiated (15-17), all of which share aminoglycoside resistance genes in addition to other determinants, likely leading to co-selection after genetic mobilization (18).

Improve understanding of the distribution of resistance genes within bacterial species in different host niches, and the mobility of these genes between populations, could be crucial for identifying source and sink populations. In the case of *Campylobacter*, the *erm*(B) gene has been identified in *C. coli* isolates from chicken, ducks, swine and humans and from *C. jejuni* isolated from chicken (15, 17, 19) but other host species may be relevant. Turkeys are among the top ten farmed animals in Europe and the USA with an estimated figure of 323 million birds reared annually (20). While studies have shown that turkeys are an important host species

harbouring large numbers of *C. jejuni* and *C. coli*, the resistance status of these strains remains unknown. This has led to the inclusion of this animal species in international surveillance programs to evaluate the levels of antibiotic resistance. In this study we carried out combined molecular microbiology and whole genome sequencing approaches to evaluate the presence of *erm*(B) and its genetic background in *Campylobacter* isolates obtained from turkeys sampled in Spain. The comparison with *erm*(B) sequences from other host species might allow further describe the microevolutionary events associated with the acquisition of this antibiotic resistance gene in *Campylobacter*.

## Material and methods

### Strains and growth conditions

*Campylobacter* isolates were recovered in 2014 (n=170; 133 *C. coli* and 37 *C. jejuni*) from turkey samples obtained in the framework of the European Antimicrobial Resistance Surveillance program (DC 652/2013) in Spain (21). Samples were collected at the largest turkey slaughterhouses from Spain located in different regions within the country. Each *Campylobacter* isolate represented a single farm and they were obtained by culturing pooled faeces from turkeys (10 animals per pool, 1170 individual fecal samples analysed). Each pooled sample was cultured on *Campylobacter* blood-free selective medium (CCDA) (Oxoid). Inoculated media were incubated at 42°C for 48 h under microaerobic conditions with a commercial gas-generating system (atmosphere generator system, Oxoid). Suspected colonies were subcultured onto blood agar (BioMérieux) at 37°C for 48 h. All strains were identified by conventional multiplex PCR of the genus *Campylobacter* that allows the differentiation between *C. coli* and *C. jejuni* with specific primers, as described previously (22).

### Antimicrobial susceptibility testing

Broth microdilution methods were performed to determine the antimicrobial susceptibility of the *Campylobacter* isolates (Minimum Inhibitory Concentrations or MICs). The following antimicrobials were tested: tetracycline, ciprofloxacin, nalidixic acid, erythromycin, streptomycin and gentamicin. Isolates were grown on blood agar plates (bioMérieux) and incubated for 48 h at 37°C under microaerophilic conditions. From growth cultures (standardized to 0.5 McFarland turbidity) were added 50 µL to 11 mL of cation-adjusted Mueller-Hinton broth (TREK Diagnostics Systems), and supplemented with 600 µL of lysed horse blood prepared in house

from defibrinated horse blood (Oxoid). EUCAMP2 microdilution plates (TREK Diagnostics Systems) were inoculated and incubated under microaerophilic conditions for 48 h at 37 °C. *C. jejuni* strain ATCC 33560 was used as a control for antimicrobial susceptibility test. Following the commission decision 2013/652/UE, the epidemiological cut-offs values considered were those described by EUCAST (23). *Campylobacter* isolates resistant to erythromycin (MICs: >8 mg/L to *C. coli* and >4 mg/L to *C. jejuni*) were selected to evaluate the presence of *erm(B)* gene.

#### Identification of *erm(B)* gene and whole-genome sequencing.

The RNA methylase gene *erm(B)* was identified by PCR as described previously (24). Amplicons were detected by gel electrophoresis using 2% agarose gels containing 10 mg/ml SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen) for 40 min at 100 mA. DNA fractions were sequenced and compared using Sanger sequencing and MEGA software (version 5.05) respectively (25, 26). *Erm(B)*-positive *Campylobacter* isolates were selected for whole genome sequencing. For DNA extraction, *Campylobacter* isolates were grown in blood agar plates (48 h at 42 °C under microaerophilic conditions) and DNA was extracted using a QiAmp DNA mini kit (Qiagen). DNA was quantified using a Nanodrop spectrophotometer before sequencing. High-throughput genome sequencing was performed using a benchtop MiSeq sequencer (Illumina), and the short read paired-end data was assembled using the *de novo* assembly algorithm, SPAdes (27). Genome sequences were archived in the web-accessible Bacterial Isolate Genome Sequence Database: BIGSdb (28), which included functionality for identifying MLST profiles based on the pubMLST database (<https://pubmlst.org/campylobacter>; accessed May 9, 2017). Allelic diversity has been evaluated using a gene-by-gene approach for genome alignment and its comparison has been developed according to the BLAST algorithm (29).

## Results

#### Antimicrobial susceptibility testing

A total of 170 *Campylobacter* isolates (133 *C. coli* and 37 *C. jejuni*) were tested for susceptibility to six antimicrobials. Antimicrobial resistance profiles (**Table 1**) and the MIC distribution were recorded (**Table S1**). The highest proportion of antimicrobial resistance was to tetracycline (168/170; 98.8%) followed by nalidixic acid/ciprofloxacin (164/170; 96.4%), erythromycin (85/170; 50%), streptomycin (82/170; 48.2%) and finally gentamicin (13/170; 7.6%). Considering separately both



species, *C. coli* and *C. jejuni*, higher prevalence of resistance was observed in *C. coli* for erythromycin, streptomycin and gentamicin (Fisher's exact test:  $p < 0.001$ ). Based upon The European Food Safety Authority (EFSA) criteria for quantifying multi-drug resistance (MDR; resistance to at least three classes of antimicrobials tested), seven MDR profiles were recorded for *Campylobacter* isolates (**Table 1**) (30). Seventy-nine *C. coli* isolates (59.4%) and three *C. jejuni* isolates (8.5%) showed resistance to ciprofloxacin (treatment used against campylobacteriosis before onset of resistance) plus erythromycin (current treatment against this bacteria). *Campylobacter* isolates resistant to erythromycin (**Table 1**) were analysed for the presence of RNA methylase gene *erm*(B).

**Table 1.** Drug resistance profiles found among 170 *Campylobacter* isolates from turkeys.

| Resistance<br>Profile <sup>1</sup> | <i>C. coli</i><br>No. of Isolates (%) | <i>C. jejuni</i><br>No. of Isolates (%) |
|------------------------------------|---------------------------------------|---|
| CTESG                              | 9 (6.76)                              | 0 (0)                                   |
| CTES                               | 46 (34.58)                            | 1 (2.70)                                |
| CTSG                               | 3 (2.25)                              | 0 (0)                                   |
| CTEG                               | 1 (0.75)                              | 0 (0)                                   |
| CTE                                | 23 (17.29)                            | 2 (5.40)                                |
| CTS                                | 20 (15.03)                            | 1 (2.70)                                |
| TES                                | 2 (1.5)                               | 0 (0)                                   |
| CT                                 | 29 (21.80)                            | 28 (75.67)                              |
| TE                                 | 0 (0)                                 | 1 (2.70)                                |
| C                                  | 0 (0)                                 | 1 (2.70)                                |
| T                                  | 0 (0)                                 | 2 (5.40)                                |
| Susceptible                        | 0 (0)                                 | 1 (2.70)                                |
| Total                              | 133 (100.00)                          | 37 (100.00)                             |

<sup>1</sup>C, ciprofloxacin; T, tetracycline; E, erythromycin; S, streptomycin; G, gentamicin.

Table S1. MIC distribution for *Campylobacter* isolates

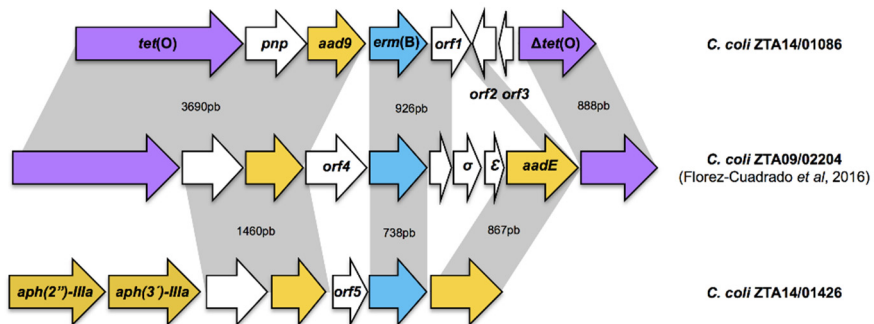
| Antimicrobial Agents | Species          | MIC Range (mg/L) | ECOFF (mg/L) <sup>1</sup> | Isolates per MIC (mg/L) |      |     |    |   |    |    |    |    |    | Resistant Isolates (%) |      |           |
|----------------------|------------------|------------------|---------------------------|-------------------------|------|-----|----|---|----|----|----|----|----|------------------------|------|-----------|
|                      |                  |                  |                           | 0.12                    | 0.25 | 0.5 | 1  | 2 | 4  | 8  | 16 | 32 | 64 | 128                    | >128 |           |
| Tetracycline         | <i>C. coli</i>   | 0.5-64           | 2                         |                         |      |     |    |   |    |    |    | 1  | 4  | 19                     | 109  | 133 (100) |
|                      | <i>C. jejuni</i> |                  | 1                         |                         | 2    |     |    | 1 |    | 3  | 1  | 8  | 13 | 9                      |      | 35 (95)   |
| Ciprofloxacin        | <i>C. coli</i>   | 0.12-16          | 0.5                       |                         |      | 1   |    |   | 21 | 42 | 50 | 19 |    |                        |      | 132 (99)  |
|                      | <i>C. jejuni</i> |                  | 0.5                       | 4                       |      | 1   | 1  | 3 | 17 | 11 |    |    |    |                        |      | 32 (88)   |
| Nalidixic Acid       | <i>C. coli</i>   | 1-64             | 16                        |                         |      |     |    |   |    | 1  |    | 17 | 72 | 43                     |      | 132 (99)  |
|                      | <i>C. jejuni</i> |                  | 16                        |                         |      |     |    |   | 3  | 1  |    | 15 | 16 | 2                      |      | 33 (89)   |
| Erythromycin         | <i>C. coli</i>   | 1-128            | 8                         |                         |      |     | 49 | 2 |    | 1  | 2  | 5  | 5  | 17                     | 52   | 81 (61)   |
|                      | <i>C. jejuni</i> |                  | 4                         |                         |      |     | 33 |   |    | 1  |    |    | 1  | 2                      |      | 4 (11)    |
| Streptomycin         | <i>C. coli</i>   | 0.25-16          | 4                         |                         | 2    | 12  | 30 | 9 |    | 1  | 5  | 74 |    |                        |      | 80 (60)   |
|                      | <i>C. jejuni</i> |                  | 4                         |                         | 16   | 16  | 3  |   |    |    |    | 2  |    |                        |      | 2 (5)     |
| Gentamicin           | <i>C. coli</i>   | 0.12-16          | 2                         | 11                      | 79   | 29  | 1  |   |    |    | 6  | 7  |    |                        |      | 13 (10)   |
|                      | <i>C. jejuni</i> |                  | 2                         | 23                      | 11   | 3   |    |   |    |    |    |    |    |                        |      | 0 (0)     |

<sup>1</sup>EUCAST: *C.coli* and *C. jejuni* data from the EUCAST MIC distribution website last accessed 18 December 2016

### ***Erm(B)*-carrying *Campylobacter* isolates from turkeys**

Among the 85 erythromycin-resistant isolates, two (2.4%) carried the *erm(B)* gene: *C. coli* ZTA14/01086 and *C. coli* ZTA14/01426. The *C. coli* ZTA14/01086 is resistant to ciprofloxacin/nalidixic acid, tetracycline, erythromycin and streptomycin, whereas *C. coli* ZTA14/01426 shares the same MDR pattern plus gentamicin resistance. The erythromycin-resistance MICs were 256 mg/L for *C. coli* ZTA14/01086 and >1024 mg/L for *C. coli* ZTA14/01426. Whole genome sequencing revealed that the *erm(B)* gene in *C. coli* ZTA14/01086 was located in a cluster along with other resistance genes, including *tet(O)* and *aad9* which confer resistance to tetracycline and spectinomycin respectively (**Figure 1**; GeneBank accession number: MF134831).

The genome of *C. coli* ZTA14/01426 isolate contained the *erm(B)* gene in a cluster with aminoglycoside resistance genes *aph(2'')-IIIa*, *aph(3')-IIIa* and *aadE* (**Figure 1**; GeneBank accession number: MF134832). Both genomic islands were compared with the *erm(B)*-carrying genomic island from *C. coli* ZTA09/02204, the unique being identified in Spain (GeneBank accession number: KT953380) (**Figure 1, Table S2**). Beside these resistance determinants, analysis of 23S rRNA and ribosomal protein (L4 and L22) genes from genomes of the *erm(B)* positive strains from turkey, excluded the presence of ribosomal mutations previously related with erythromycin resistance (31).



**Figure 1.** Comparative genetic organization of *erm(B)*-carrying genomic islands from *C. coli* ZTA14/01086 (this study), *C. coli* ZTA14/01426 (this study) and previously identified *C. coli* ZTA09/02204 (Study 2 of this doctoral thesis) (17). Antimicrobial resistance genes are coloured: erythromycin resistance: blue, aminoglycoside resistance: yellow, tetracyclin resistance: purple, genes with predicted functions or encoding hypothetical proteins: white. The grey shading indicates regions sharing 98% DNA identity.

**Table S2.** Genetic annotation of the genomic islands identified in *Campylobacter* isolates from this study.

| Strain              | Gene<br>or ORF        | Protein | Homologous<br>Protein <sup>a</sup> | Amino Acid<br>Identity (%) | Annotation/Blast hit  |
|---------------------|-----------------------|---------|------------------------------------|----------------------------|---|
| C. coli ZTA14/01086 | <i>ter</i> (O)        | 639     | 639                                | 639/639(100)               | TetW/TetW/TetO/TetS family tetracycline resistance [Campylobacter] / WP_021137831 |
|                     | <i>pnp</i>            | 256     | 256                                | 255/256(99)                | phosphorylase [Campylobacter coli] / WP_057033214                                 |
|                     | <i>aad9</i>           | 259     | 160                                | 160/160(100)               | ANT9 [Campylobacter]/ WP_057031337  |
|                     | <i>erm</i> (B)        | 245     | 245                                | 57/68(84%)                 |   |
|                     | <i>orf1</i>           | 85      | 288                                | 243/245(99)                | methyltransferase Erm(B) [Campylobacter coli] / WP_060794049                      |
|                     | <i>orf2</i>           | 108     | 108                                | 42/42(100)                 | Aminoglycoside nucleotidyltransferase ANT6 [Firmicutes] / WP_006426509            |
|                     | <i>orf3</i>           | 81      | 81                                 | 105/108(97)                | Hypothetical protein [Campylobacter coli] / WP_072238494                          |
|                     | <i>ter</i> (O)        | 639     | 295                                | 81/81(100)                 | Hypothetical protein [Bacteroidales] / WP_032585129                               |
|                     |                       |         |                                    | 294/295(99)                | TetW/TetW/TetO/TetS family tetracycline resistance [Campylobacter] / WP_021137831 |
|                     | <i>aph</i> (2'')-IIIa | 303     | 306                                | 301/303(99)                | Aminoglycoside APH(2'')-IIIa [Campylobacter coli] / WP_057037356                  |
| C. coli ZTA14/01426 | <i>aph</i> (3'')-IIIa | 264     | 264                                | 264/264(100)               | Aminoglycoside APH(3'')-IIIa [Bacteria] / WP_001096887                            |
|                     | <i>pnp</i>            | 256     | 256                                | 254/256(99)                | phosphorylase [Campylobacter coli] / WP_057033214                                 |
|                     | <i>aad9</i>           | 218     | 218                                | 218/218(100)               | streptomycin 3''-adenylyltransferase [Campylobacter coli CVM N29716] / ERF99003   |
|                     | <i>orf4</i>           | 139     | 139                                | 138/139(99)                | ATPase [Clostridioides difficile] / WP_021397753                                  |
|                     | <i>erm</i> (B)        | 245     | 245                                | 244/245(99)                | 23S rRNA Erm(B) [Campylobacter coli] / WP_060794049                               |
|                     | <i>ant6</i>           | 288     | 288                                | 287/288(99)                | Aminoglycoside ANT6 [Firmicutes] / WP_006426509                                   |
|                     |                       |         |                                    |                            |   |

<sup>a</sup>Homologous protein from the organism listed in the annotation/Blast hit column

***Erm(B)* allelic variation among bacterial genera, hosts and countries.**

Comparative sequence homology can provide information about the horizontal transfer of resistance genes, including *erm(B)*, among bacterial species. The nucleotide sequences of ten *erm(B)* genes present in *Campylobacter* were compared, two from this work and eight of Chinese and Spanish origin. Using the first *erm(B)* sequence described in *Campylobacter* as reference (*C. coli* ZC113; GeneBank accession number: KC575115), four alleles have been identified in the *erm(B)* sequences from *Campylobacter* (**Table S3**). Allele 1 was the most common (7/10) and was using as reference. Alleles 2 and 3 were present in only one *C. coli* isolate each from Spain with single nucleotide polymorphisms (SNPs) A299G (Asn-100-Ser) and A353G (His-118-Arg), respectively. Allele 4 was found in a *C. jejuni* isolate from China and is characterized by the synonymous SNP C726T. Bacterial genera, hosts and origins where *erm(B)* sequences identical to the four alleles present in *Campylobacter* are available in NCBI databases were compiled (S3 File) and their interconnections determined (**Figure 2**).

The *erm(B)* alleles detected in *Campylobacter* had been previously identified mainly in *Enterococcus* and *Staphylococcus* isolated from humans and pigs in Asia and Europe. Thus, allele 1 of *erm(B)* is represented by 31 sequences from eight bacterial species, including *Streptococcus suis* (11/31; 35.5%), *Enterococcus faecium* (7/31; 22.5%) and *C. coli* (7/31; 22.5%). *S. suis* isolates were mainly isolated in China (7/11; 63.6%) and all were from swine hosts. Sequences of *E. faecium* were mainly from Japan (4/7; 57.1%) and all of them are from humans. The majority of *erm(B)* sequences of allele 1 from *Campylobacter* were of Chinese origin (6/7; 85.7%) and sampled from humans, swine and chickens. Beside these, allele 2 of *erm(B)* was detected in sixteen bacterial species mainly *Clostridium difficile* (10/39; 25.6%) and *Enterococcus faecium* (7/39; 17.9%), from European and US people, and pigs of Chinese origin respectively. Allele 2 of *erm(B)* is slightly more common in NCBI database than allele 1, being the only one identified in six bacterial genomes, mainly *E. faecium* (10/22; 45.4%) sampled from humans in the US, Australia, Japan and South Korea, whereas the allele 4 of *erm(B)* was not identified in any other sequence available in public databases.

**Table S3.** Host and geographical distribution of the *erm*(B) alleles identified in *Campylobacter*.

| Allele | Specie                                 | Country | Host      | GeneBank ID |
|--------|--|---------|-----------|-------------|
| 1      | <i>Campylobacter coli</i> (reference)  | China   | Swine     | KC575115    |
|        | <i>Campylobacter coli</i> <sup>1</sup> | Spain   | Turkey    | This study  |
|        | <i>Campylobacter coli</i>              | China   | Swine     | KJ610808    |
|        | <i>Campylobacter coli</i>              | China   | Human     | KC876752    |
|        | <i>Campylobacter coli</i>              | China   | Human     | KC876751    |
|        | <i>Campylobacter coli</i>              | China   | Human     | KC876750    |
|        | <i>Campylobacter coli</i>              | China   | Chicken   | KC876748    |
|        | <i>Enterococcus faecium</i>            | Japan   | Human     | NG_047804   |
|        | <i>Enterococcus faecium</i>            | China   | Wild boar | KJ645709    |
|        | <i>Enterococcus faecium</i>            | Japan   | Human     | JN899585    |
|        | <i>Enterococcus faecium</i>            | Japan   | Human     | JN899583    |
|        | <i>Enterococcus faecium</i>            | Japan   | Human     | JN899582    |
|        | <i>Enterococcus faecium</i>            |         | Human     | HM565169    |
|        | <i>Enterococcus hirae</i>              | China   | Food      | CP015517    |
|        | <i>Lactobacillus plantarum</i>         | France  | Food      | FJ374272    |
|        | <i>Staphylococcus aureus</i>           | Taiwan  | Human     | LC102479    |
|        | <i>Staphylococcus aureus</i>           | Taiwan  | Human     | LC125352    |
|        | <i>Streptococcus pyogenes</i>          | Italy   | Human     | FN677480    |
|        | <i>Streptococcus suis</i>              | China   | Wild boar | CP017142    |
|        | <i>Streptococcus suis</i>              | China   | Swine     | KT336321    |
|        | <i>Streptococcus suis</i>              | China   | Swine     | CP015557    |
|        | <i>Streptococcus suis</i>              | Canada  | Swine     | CP011419    |
|        | <i>Streptococcus suis</i>              | China   | Swine     | CP003922    |
|        | <i>Streptococcus suis</i>              | China   | Swine     | CP002644    |
|        | <i>Streptococcus suis</i>              | China   | Swine     | CP002640    |
|        | <i>Streptococcus suis</i>              | China   | Swine     | CP002465    |
|        | <i>Streptococcus suis</i>              | Itali   | Human     | FN997652    |
|        | <i>Streptococcus suis</i>              | Italy   | Human     | FN677479    |
|        | <i>Streptococcus suis</i>              | Vietnam | Human     | FM252032    |
| 2      | <i>Anaerostipes hadrus</i>             | China   | Human     | CP012098    |
|        | <i>Arcanobacterium pyogenes</i>        | USA     |           | AY334073    |
|        | <i>Campylobacter coli</i> <sup>2</sup> | Spain   | Chicken   | KT953380    |
|        | <i>Peptoclostridium difficile</i>      | Germany | Human     | HG475346    |

**Table S3.** Host and geographical distribution of the *erm*(B) alleles identified in *Campylobacter*.

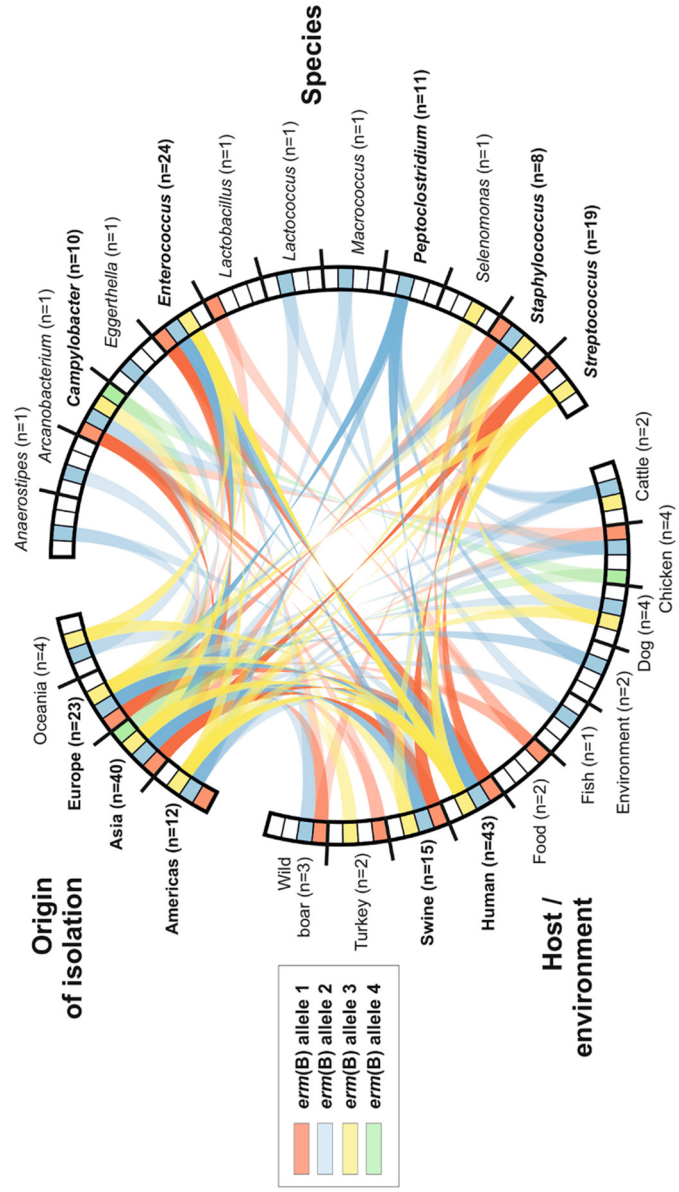
| Allele | Specie                                 | Country     | Host        | GeneBank ID |
|--------|--|-------------|-------------|-------------|
| 2      | <i>Peptoclostridium difficile</i>      | Germany     | Human       | HF678446    |
|        | <i>Peptoclostridium difficile</i>      | Italy       | Human       | HF678445    |
|        | <i>Peptoclostridium difficile</i>      | USA         | Human       | FN668944    |
|        | <i>Peptoclostridium difficile</i>      | Ireland     | Human       | FN668375    |
|        | <i>Peptoclostridium difficile</i>      | USA         | Cattle      | FN665654    |
|        | <i>Peptoclostridium difficile</i>      | Italy       | Human       | AM072511    |
|        | <i>Peptoclostridium difficile</i>      | Italy       | Human       | AJ968665    |
|        | <i>Clostridium perfringens</i>         | Canada      | Chicken     | JQ655732    |
|        | <i>Eggerthella spp.</i>                | Japan       | Human       | AP012211    |
|        | <i>Enterococcus faecalis</i>           | Taiwan      | Human       | AB563188    |
|        | <i>Enterococcus faecium</i>            | Australia   | Human       | LT598667    |
|        | <i>Enterococcus faecium</i>            | China       | Swine       | KX156279    |
|        | <i>Enterococcus faecium</i>            | China       | Swine       | KX156278    |
|        | <i>Enterococcus faecium</i>            | Germany     | Human       | CP011830    |
|        | <i>Enterococcus faecium</i>            | China       | Wild boar   | KJ645709    |
|        | <i>Enterococcus faecium</i>            | China       | Swine       | KF421157    |
|        | <i>Enterococcus faecium</i>            | Japan       | Human       | JN899587    |
|        | <i>Lactococcus garvieae</i>            | Japan       | Fish        | AB290882    |
|        | <i>Macrococcus caseolyticus</i>        | Human       | Japan       | AP009486    |
|        | <i>Peptoclostridium difficile</i>      | Spain       | Environment | LK933416    |
|        | <i>Peptoclostridium difficile</i>      | Spain       | Environment | LK932404    |
|        | <i>Staphylococcus aureus</i>           | Germany     | Cattle      | FN806789    |
|        | <i>Staphylococcus aureus</i>           | China       | Swine       | JX560992    |
|        | <i>Staphylococcus intermedius</i>      | Switzerland | Dog         | AF239773    |
| 3      | <i>Campylobacter coli</i> <sup>3</sup> | Spain       | Turkey      | This study  |
|        | <i>Enterococcus faecium</i>            | South Korea | Human       | CP019210    |
|        | <i>Enterococcus faecium</i>            | USA         | Human       | CP018072    |
|        | <i>Enterococcus faecium</i>            | USA         | Human       | CP012468    |
|        | <i>Enterococcus faecium</i>            | Australia   | Human       | LT603681    |
|        | <i>Enterococcus faecium</i>            | USA         | Human       | CP013996    |
|        | <i>Enterococcus faecium</i>            | Australia   | Human       | KR066794    |
|        | <i>Enterococcus faecium</i>            | Australia   | Human       | CP006623    |
|        | <i>Enterococcus faecium</i>            | Japan       | Human       | JN899586    |



**Table S3.** Host and geographical distribution of the *erm*(B) alleles identified in *Campylobacter*.

| Allele | Specie                            | Country | Host    | GeneBank ID |
|--------|-----------------------------------|---------|---------|-------------|
| 3      | <i>Enterococcus faecium</i>       | Japan   | Human   | JN899584    |
|        | <i>Selenomonas spp.</i>           | USA     | Human   | CP014240    |
|        | <i>Staphylococcus intermedius</i> | USA     | Dog     | CP015626    |
|        | <i>Staphylococcus intermedius</i> | USA     | Dog     | CP016073    |
|        | <i>Staphylococcus intermedius</i> | Spain   | Dog     | JF909978    |
|        | <i>Streptococcus pneumoniae</i>   | France  | Human   | HG799498    |
|        | <i>Streptococcus pneumoniae</i>   | Germany | Human   | HG799489    |
|        | <i>Streptococcus pneumoniae</i>   | Canada  | Human   | CP002925    |
|        | <i>Streptococcus pneumoniae</i>   | Italy   | Human   | FN667862    |
|        | <i>Streptococcus pneumoniae</i>   | Taiwan  | Human   | CP001033    |
|        | <i>Streptococcus suis</i>         | Canada  | Swine   | CP012731    |
|        | <i>Streptococcus suis</i>         | China   | Swine   | CP002644    |
| 4      | <i>Campylobacter jejuni</i>       | China   | Chicken | KF864551    |

<sup>1</sup>*C. coli* ZTA14/01426, <sup>2</sup>*C. coli* ZTA09/02204, <sup>3</sup>*C. coli* ZTA14/01086.



**Figure 2.** Host and geographical distribution of the *erm*(B) alleles identified in *Campylobacter* in this study among other bacterial genera. Exact identity of *erm*(B) alleles between species, host/environment and origin of isolation is represented by a connection.

## Discussion

Definitive characterization of erythromycin resistance in bacterial pathogens is an important objective defined by the EFSA and the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (30). To date, the *erm(B)* gene has been identified in *Campylobacter* isolates from swine, chickens, ducks and humans from China and in one broiler sample from Spain (16, 17). Monitoring antimicrobial resistance among *Campylobacter* isolated from turkeys has been mandatory since 2014 in European countries where the production of turkey meat exceeds 10,000 tonnes per year (32). The occurrence of erythromycin resistant *C. coli* isolates from turkeys in Germany, Romania and Spain had risen to 43.3% in 2014 (32), compared to previous surveys where lower frequencies were detected for poultry (14.5%) and swine (20.7%) (32, 33). Since *Campylobacter* infections are related to consumption of food from animal origin, these levels of resistance could potentially produce therapeutic failure of antibiotic treatment for campylobacteriosis in humans.

Increased antimicrobial resistance among *Campylobacter* populations is a consequence of the widespread acquisition of antimicrobial resistance and clonal expansion of resistant lineages (34). *Campylobacter* can acquire DNA, including antimicrobial resistance genes, from relatively distantly related lineages through horizontal gene transfer (HGT), involving the replacement of homologous sequences, or the acquisition of mobile genetic elements (MGEs). There is evidence that plasmid acquisition mediates *Campylobacter* resistance to tetracycline, chloramphenicol and aminoglycosides (35-37) but, in some cases, these resistances might be conferred by polymorphism of chromosomal sequences. This is also the case in *Campylobacter* for resistance to fluoroquinolones and macrolides mediated by mutations in *gyrA* or 23S rDNA sequences, respectively (38). Mutations that confer antimicrobial resistance can occur independently in multiple lineages but can also spread by natural transformation followed by homologous recombination leading to the dissemination of antimicrobial resistance among bacteria that share an ecological niche (39).

The increasing number of studies identifying *erm(B)* gene in *Campylobacter* provide evidence that horizontal transfer is related with macrolide resistance in *Campylobacter* (15-17, 19, 30). High levels of resistance among *C. coli* isolates have been previously reported among isolates from livestock (40), potentially reflecting a selective advantage in these niches and clonal expansion of resistance lineages. However, few studies have characterized the genomic changes

associated with the acquisition of resistance. This study shows the location of *erm*(B) gene in a genomic island along with other antimicrobial resistance genes including: *tet*(O), encoding resistance to tetracycline and *aph*(3')-IIIa, *aacA-aphD*, *aad9* and *aadE* conferring resistance to different aminoglycosides (15-17), a clustering that implies the possibility of co-selection as its evolutionary mechanism (18). In addition, linked *Erm*(B) and *aph*(2'')-IIIa genes detected in the genome of *C. coli* ZTA14/01426 isolate, could be transferred to virulent strains limiting seriously the effectiveness of the two main choices for treatment of severe campylobacteriosis, erythromycin and gentamicin (6).

Identical nucleotide sequences of antibiotic resistance genes have been detected in both, Gram-positive and Gram-negative bacteria. This is consistent with horizontal gene transfer facilitating the spread of resistance genes between distantly related species (41, 42). Gram-positive bacteria including *Enterococcus*, *Streptococcus* and *Staphylococcus* are widely known to harbour various resistance genes (43, 44) and recently, tetracycline and aminoglycoside resistance genes from Gram-positive bacteria have been identified in Gram-negative bacteria including *E. coli* or *K. pneumoniae* (45, 46) and *Campylobacter* (43, 44, 47). Four *erm*(B) alleles were identified in *Campylobacter* in this study (Table S3) and comparison of these alleles with those from other bacteria provides useful information about possible routes of transmission (Fig 2). First, 100% nucleotide identity with *erm*(B) genes from *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Peptoclostridium*, *Anaerostipes*, *Arcanobacterium*, *Eggerthella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Macrococcus* and *Selenomonas* suggests horizontal acquisition from Gram-positive bacteria, as previously described (15-17). Second, the *erm*(B) alleles identified in this study have been previously identified mainly in human and porcine bacterial pathogens of Asian and European origin (Fig 2). The pig and human pathogen *S. suis* is considered a reservoir of antibiotic resistance genes (48) and genetic transferable element carrying the *erm*(B), *tet*(O) and aminoglycoside resistance genes have been reported in isolates of *S. suis* previously (49). The use of combined antibiotic therapies on swine farms potentially selects for bacterial isolates carrying resistance to different antibiotics (50).

Allele 2 of the *erm*(B) gene has been identified in more bacterial genera than the other alleles in this study (Fig 2). All bacterial genera where *erm*(B) allele 2 has been identified belong to the Firmicutes, except two which belong to Actinobacteria. These bacterial genera are present in the gastrointestinal tract and species like

*Enterococcus*, *Streptococcus* and *Staphylococcus* share the niche with *Campylobacter* (43). The transfer of antibiotic resistance genes in the human colon between bacteria of different genera has been reported (51) and it is possible that the antibiotics supplied in both animals and humans could facilitate the selection of strains carrying these multiresistant genomic islands and favour their dispersion. Identifying *erm*(B) genes and multi-drug resistance genomic islands in *Campylobacter* isolates from turkeys, adds new elements to the already extensive network of bacterial genera and hosts involved in the possible dispersion of critical antibiotic resistance genes and mobile genetic elements.

## References

1. Lawe-Davies O and Bennett S. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. World Health Organization. 2017. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/>
2. EFSA (European Food Safety Authority) ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. EFSA Journal. 2016;14(12):4634-865.
3. Whiley H, van den Akker B, Giglio S, Bentham R. The role of environmental reservoirs in human campylobacteriosis. Int J Environ Res Public Health. 2013;10(11):5886-907.
4. Wilson DJ, Gabriel E, Leatherbarrow AJ, Cheesbrough J, Gee S, Bolton E, et al. Tracing the source of campylobacteriosis. PLoS Genet. 2008;4(9):e1000203.
5. Nachamkin I, Mishu Allos B and Ho T. *Campylobacter* species and Guillain-Barré syndrome. Clin Microbiol Rev. 1998;11(3):555-567.
6. Mirva Lehtopolku U-MN, Pirkko Kotilainen, Pentti Huovinen, Anja Siitonen and Antti J. Hakanen. Antimicrobial susceptibilities of multidrug-resistant *Campylobacter jejuni* and *C. coli* strains: In vitro activities of 20 antimicrobial agents. Antimicrob Agents Chemother. 2009;54(3):5.
7. Fyfe C, Grossman TH, Kerstein K, Sutcliffe J. Resistance to macrolide antibiotics in public health pathogens. Cold Spring Harb Perspect Med. 2016;6(10).
8. Weisblum B. Erythromycin resistance by ribosome modification. Antimicrob Agents Chemother. 1995;39(3):577-85.
9. Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. Clin Infect Dis. 2002;34(4):482-92.
10. Jensen LB, Frimodt-Møller N, Aarestrup FM. Presence of *erm* gene classes in gram-positive bacteria of animal and human origin in Denmark. FEMS Microbiol Lett. 1999;170(1):151-8.
11. Conwell M, Daniels V, Naughton PJ, Dooley JS. Interspecies transfer of vancomycin,

- erythromycin and tetracycline resistance among *Enterococcus* species recovered from agrarian sources. BMC Microbiol. 2017;17(1):19.
12. Shoemaker NB, Vlamakis H, Hayes K, Salyers AA. Evidence for extensive resistance gene transfer among *Bacteroides* spp. and among *Bacteroides* and other genera in the human colon. Appl Environ Microbiol. 2001;67(2):561-8.
13. Phuc Nguyen MC, Woerther PL, Bouvet M, Andremont A, Leclercq R, Canu A. *Escherichia coli* as reservoir for macrolide resistance genes. Emerg Infect Dis. 2009;15(10):1648-50.
14. Soge OO, Adeniyi BA, Roberts MC. New antibiotic resistance genes associated with CTX-M plasmids from uropathogenic Nigerian *Klebsiella pneumoniae*. J Antimicrob Chemother. 2006;58(5):1048-53.
15. Qin S, Wang Y, Zhang Q, Zhang M, Deng F, Shen Z, et al. Report of ribosomal RNA methylase gene *erm(B)* in multidrug-resistant *Campylobacter coli*. J Antimicrob Chemother. 2014;69(4):964-8.
16. Florez-Cuadrado D, Ugarte-Ruiz M, Quesada A, Palomo G, Dominguez L, Porrero MC. Description of an *erm(B)*-carrying *Campylobacter coli* isolate in Europe. J Antimicrob Chemother. 2016;71(3):841-3.
17. Wang Y, Zhang M, Deng F, Shen Z, Wu C, Zhang J, et al. Emergence of multidrug-resistant *Campylobacter* species isolates with a horizontally acquired rRNA methylase. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(9):5405-12.
18. Chapman JS. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. Int Biodeterior Biodegradation. 2003;51(4):6.
19. Deng F, Wang Y, Zhang Y, Shen Z. Characterization of the genetic environment of the ribosomal RNA methylase gene *erm(B)* in *Campylobacter jejuni*. J Antimicrob Chemother. 2015;70(2):613-5.
20. FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2017. Available from: <http://www.fao.org/faostat/en>
21. European Commission. Commission implementing decision of 12 November 2013 on the monitoring and reporting of antimicrobial resistance in zoonotic and commensal bacteria (2013/652/EU). Official Journal of the European Union, 2013: p. 13.
22. Ugarte-Ruiz M, Gómez-Barrero S, Porrero MC, Alvarez J, García M, Comerón MC, Wassenaar TM and Domínguez L. Evaluation of four protocols for the detection and isolation of thermophilic *Campylobacter* from different matrices. J Appl Microbiol. 2012;113(1):200-208.
23. EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Available from: <http://www.eucast.org>
24. Chen J, Yu Z, Michel FC, Jr., Wittum T, Morrison M. Development and application of real-time PCR assays for quantification of *erm* genes conferring resistance to macrolides-lincosamides-streptogramin B in livestock manure and manure management systems. Appl Environ Microbiol. 2007;73(14):4407-16.
25. Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history

- of sequencing DNA. *Genomics*. 2016;107(1):1-8.
26. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*. 2011;28(10):2731-9.
27. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol*. 2012;19(5):455-77.
28. Jolley KA, Maiden MC. BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC Bioinformatics*. 2010;11:595.
29. Sheppard SK, Jolley KA, Maiden MC. A gene-by-gene approach to bacterial population genomics: Whole genome MLST of *Campylobacter*. *Genes (Basel)*. 2012;3(2):261-77.
30. EFSA (European Food Safety Authority) ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2015. *EFSA Journal*. 2017;15(2):4694-906.
31. Gibreel A, Kos VN, Keelan M, Trieber CA, Levesque S, Michaud S, et al. Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*: molecular mechanism and stability of the resistance phenotype. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(7):2753-9.
32. EFSA (European Food Safety Authority) ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014. *EFSA Journal*. 2016;14(2):4380-587.
33. EFSA (European Food Safety Authority) ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013. *EFSA Journal*. 2015;13(2):4036-214.
34. Wimalarathna HM, Richardson JF, Lawson AJ, Elson R, Meldrum R, Little CL, et al. Widespread acquisition of antimicrobial resistance among *Campylobacter* isolates from UK retail poultry and evidence for clonal expansion of resistant lineages. *BMC Microbiol*. 2013;13:160.
35. Taylor DE, Hiratsuka K, Ray H, Manavathu EK. Characterization and expression of a cloned tetracycline resistance determinant from *Campylobacter jejuni* plasmid pUA466. *J Bacteriol*. 1987;169(7):2984-9.
36. Courvalin PM, Shaw WV, Jacob AE. Plasmid-mediated mechanisms of resistance to aminoglycoside-aminocyclitol antibiotics and to chloramphenicol in group D streptococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 1978;13(5):716-25.
37. Wang Y, Taylor DE. Chloramphenicol resistance in *Campylobacter coli*: nucleotide sequence, expression, and cloning vector construction. *Gene*. 1990;94(1):23-8.

38. Engberg J, Aarestrup FM, Taylor DE, Gerner-Smidt P, Nachamkin I. Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates. *Emerg Infect Dis*. 2001;7(1):24-34.
39. Meric G, Miragaia M, de Been M, Yahara K, Pascoe B, Mageiros L, et al. Ecological Overlap and Horizontal Gene Transfer in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Genome Biol Evol*. 2015;7(5):1313-28.
40. Thakur S, Gebreyes WA. *Campylobacter coli* in swine production: antimicrobial resistance mechanisms and molecular epidemiology. *J Clin Microbiol*. 2005;43(11):5705-14.
41. Courvalin P. Transfer of antibiotic resistance genes between gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994;38(7):1447-51.
42. Trieu-Cuot P, Gerbaud G, Lambert T, Courvalin P. In vivo transfer of genetic information between gram-positive and gram-negative bacteria. *EMBO J*. 1985;4(13A):3583-7.
43. Zilhao R, Papadopolou B, Courvalin P. Occurrence of the *Campylobacter* resistance gene *tetO* in *Enterococcus* and *Streptococcus* spp. *Antimicrob Agents Chemother*. 1988;32(12):1793-6.
44. Pinto-Alphandary H, Mabilat C, Courvalin P. Emergence of aminoglycoside resistance genes *aadA* and *aadE* in the genus *Campylobacter*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990;34(6):1294-6.
45. Brisson-Noel A, Arthur M, Courvalin P. Evidence for natural gene transfer from gram-positive cocci to *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1988;170(4):1739-45.
46. Arthur M, Andremont A, Courvalin P. Distribution of erythromycin esterase and rRNA methylase genes in members of the family Enterobacteriaceae highly resistant to erythromycin. *Antimicrob Agents Chemother*. 1987;31(3):404-9.
47. Lambert T, Gerbaud G, Trieu-Cuot P, Courvalin P. Structural relationship between the genes encoding 3'-aminoglycoside phosphotransferases in *Campylobacter* and in gram-positive cocci. *Ann Inst Pasteur Microbiol (1985)*. 1985;136B(2):135-50.
48. Palmieri C, Varaldo PE, Facinelli B. *Streptococcus suis*, an emerging drug-resistant animal and human pathogen. *Front Microbiol*. 2011;2:235.
49. Palmieri C, Magi G, Mingoia M, Bagnarelli P, Ripa S, Varaldo PE, et al. Characterization of a *Streptococcus suis* tet(O/W/32/O)-carrying element transferable to major streptococcal pathogens. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(9):4697-702.
50. Zhu YG, Johnson TA, Su JQ, Qiao M, Guo GX, Stedtfeld RD, et al. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(9):3435-40.
51. Huddleston JR. Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes. *Infect Drug Resist*. 2014;7:167-76.



#### **6.4 Caracterización genómica y resistoma de *C. jejuni* y *C. coli* aislados de personas, animales y aguas residuales.**

En el año 2012 se describieron en aislados de *Campylobacter* procedentes de China, unas islas genómicas portadoras de varios genes de resistencia a aminoglucósidos (171). Dos años más tarde se identificaron en *Campylobacter* aislados de animales y personas de China, islas genómicas portadoras de genes de resistencia a aminoglucósidos y macrólidos, poniendo en riesgo por tanto el tratamiento contra la campilobacteriosis (150). En los anteriores trabajos de esta tesis doctoral se identificaron por primera vez en Europa islas genómicas portadoras de genes de resistencia a aminoglucósidos y macrólidos en *C. coli* aislados de pollos y pavos (151). Dado que los aminoglucósidos, principalmente gentamicina, se utilizan para el tratamiento de infecciones sistémicas causadas por *Campylobacter*, la aparición y propagación de esta isla genómica de resistencia a antimicrobianos supone un riesgo potencial para la salud pública (185).

Este trabajo surge de la necesidad de analizar las islas genómicas en *Campylobacter* en España sobre la dispersión de genes de resistencia a antimicrobianos en animales, personas y aguas residuales. Este estudio se desarrolló a partir de una colección de 252 aislados de *Campylobacter* (163 *C. jejuni* y 89 *C. coli*) procedentes de animales de abasto (pollos de engorde, ganado porcino y bovino de engorde), personas infectadas por campilobacteriosis y efluentes urbanos. Se evaluó la sensibilidad a seis antimicrobianos (tetraciclina, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, eritromicina, gentamicina y estreptomycin) y se secuenció el genoma de todos los aislados de *Campylobacter* con el objetivo de caracterizar la colección según su genoma, evaluar los genes de resistencia a antimicrobianos que presentaban y comparar los datos de resistencia fenotípicos y genéticos.

Siguiendo el criterio de la EFSA, se agruparon los aislados en multirresistentes, si eran resistentes a tres o más clases de antimicrobianos, y no multirresistentes. Nuestros resultados muestran como hay mayor porcentaje de aislados multirresistentes en *C. coli* (56.25%) que en *C. jejuni* (9.24%), con una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ).

Aislados multiresistentes de *C. jejuni* se encuentran en diferentes CCs, siendo los mayoritarios CC-45 (3/10; 30%) y CC-21 (5/29; 17%). En el caso de los aislados de *C. coli*, se han identificado 28 STs diferentes y todos pertenecen al CC-828. Los STs mayoritarios de *C. coli* fueron ST-825 (19/92; 20,65%) y ST-827 (16/92; 17,39%).

La presencia de los genes *ant(6)-lb*, *sat-4*, *ant-like*, *ant(6)-la*, *aad9*, *sat-1*, *aph(2)-IIIa*, *aph(3)-IIIa*, *lnuC* e *hyg* se asocia con aislados multiresistentes ( $p < 0,001$ ). El gen *blaOXA-61* es más prevalente en *C. jejuni* que en *C. coli* (108/168; 64.3% y 47/92; 51.09% respectivamente) ( $p < 0.05$ ). El gen *blaOXA-61* es más frecuente en *Campylobacter* aislados de animales (25/28, 89.23%) que en los aislados de personas (15/25, 60%) o de aguas residuales (9/27, 33.33%).

Todos los genes de resistencia a antimicrobianos, excepto *blaOXA-61* y *ant-like*, identificados en este estudio se localizaron en 30 islas genómicas de *Campylobacter* aislados de animales, personas y aguas residuales. Comparando todas las islas genómicas identificadas, vemos que hay dos tipos de asociaciones genéticas y ambas se repiten en aislados de animales, personas y agua residual. Por un lado la asociación entre los genes *ant(6)-la*, *sat-4* y *aph(3)-III*, identificada en 16 islas genómicas: 4 en *C. jejuni* aislados de pollos (4/4; 100%) y 12 en *C. coli* aislados de pollos (1/12; 8%), vacas (2/12; 17%), personas (5/12; 42%) y aguas residuales (2/12; 17%). Por otro lado, la asociación entre los genes *tetO*, *ant(9)* y *ant(6)-lb* identificada en 14 islas genómicas: 3 en *C. jejuni* aislados de pollos y personas (2/3; 67% y 1/3; 34%, respectivamente) y 11 en *C. coli* aislados de animales (3/11; 27%), personas (3/11; 27%) y aguas residuales (5/11; 45%).

Con el objetivo de identificar la posible transferencia horizontal entre *C. jejuni* y *C. coli*, se ha analizado la diversidad alélica de los genes de resistencia a antimicrobianos identificados. Se identificaron alelos idénticos en ambas especies de los genes *blaOXA-61*, *tetO*, *ant(6)-la*, *ant(6)-lb* y *sat-4*.

## **Multidrug resistance genomic islands in *C. jejuni* and *C. coli* isolates from humans, animals and wastewater.**

### **Abstract**

Bacteria of the genus *Campylobacter* are the main cause of human infections with zoonotic origin in the European Community, with *C. jejuni* and *C. coli* as major species associated to the consumption of food products from livestock. In addition to its impact on human health, this bacterium is able to spread antibiotic resistance mobilizing genomic islands that confer resistance to aminoglycosides and macrolides, among others. The aim of this study was to evaluate the potential for horizontal transfer of antibiotic resistance genes in *Campylobacter* by comparing the multi-drug resistance genomic islands of a vast collection of strains isolated from animals, humans and wastewater. Thus, the susceptibility to six antibiotics was analysed in a collection of 252 *Campylobacter* isolates from Spain, followed by their whole genome sequencing in order to identify antimicrobial-resistance genes. Regarding the EFSA criteria, there were significant differences between the prevalence of multiresistant isolates within species, being much lower for *C. jejuni* (9.24%) than *C. coli* (56.25%). Genes *ant(6)-Ib*, *sat-4*, *ant-like*, *ant(6)-Ia*, *aad9*, *sat-1*, *aph(2)-IIIa*, *aph(3)-IIIa*, *InuC* and *hyg* were found frequently in multiresistant isolates, most of them being located in some of the thirty genomic island identified in *Campylobacter* from animals, humans and sewage. This work reveals how sewage is a potential vehicle for transmission of *Campylobacter* isolates carrying antibiotic resistance genes to the environment.

### **Introduction**

*Campylobacter* is the zoonotic agent that produces the largest number of bacterial infections in humans in the European Union, considerably exceeding cases of salmonellosis [1]. Species of this genus that cause human infections are mainly *C. jejuni* and *C. coli* [2]. Both species asymptotically colonize the digestive tract of birds and mammals and through the food chain, mainly poultry meat, infect humans and cause campylobacteriosis [3-6]. This disease is usually self-limiting, although occasionally it may require treatment based on hydration, replacement of electrolytes and even antibiotics, as erythromycin [7].

The genus *Campylobacter* is characterized by a high horizontal gene transfer rate even between strains of *C. jejuni* and *C. coli* species [8]. This genetic flow has a great impact both on the population structure and the dispersion of antibiotic resistance genes of *Campylobacter*. Transferable multiresistance genomic islands have been identified in the genome of *Campylobacter* [9]. In the year 2014, isolates of *Campylobacter* from animals and humans in China were identified whose genomic islands also carried the erythromycin resistance gene *erm*(B) [10, 11]. More recently the erythromycin resistance gene *erm*(B) was detected in *C. coli* isolates from Spain in both turkeys and chickens [12]. After the raise of resistance to quinolones in *Campylobacter*, erythromycin is considered the antibiotic of choice for treatment of campylobacteriosis, although the spread of *erm*(B) genes is compromising antimicrobial chemotherapy.

Resistance to antibiotics is causing a crisis in public health, which means that new solutions are needed. One of the alternatives proposed by the World Health Organization (WHO) has been to prioritize research on new antimicrobials. WHO has published a list of the main pathogens in terms of antibiotic-resistance, and *Campylobacter* was included [13]. Health organizations and the scientific community have recommended that antibiotic resistance should be considered from a global perspective encompassing animals, humans and the environment, the One Health approach [14]. In this context, the objective of present work was to analyse the resistome of *Campylobacter* isolates from animals, humans and wastewater to evaluate the potential impact of gene mobilization from a global health perspective.

## Material and methods

### Bacterial isolates

This study was developed on a collection of 252 *Campylobacter* isolates (163 *C. jejuni* and 89 *C. coli*) from food animals, humans and urban effluents, all sampled in Spain. *Campylobacter* isolates of animal origin (n=55; 44 *C. jejuni* and 11 *C. coli*) are from broiler (n=25; 18 *C. jejuni* and 7 *C. coli*), cattle (n=27; 26 *C. jejuni* and 1 *C. coli*) and pig (n=3 *C. coli*) samples collected in a dispersed range of slaughterhouses across the Spain (2008-2011). The isolates of animal origin belong to the Spanish Veterinary Antimicrobial Resistance Surveillance (VAV) Network and were selected with the aim of having a wide range of resistance to antibiotics (from susceptible isolates to resistant to 1-5 antibiotics) as shown in **Table 1** [15]. The human isolates (n=148; 115 *C. jejuni* and 33 *C. coli*) come from

campylobacteriosis cases occurring in hospitals in the regions of Castilla y León, Extremadura and Andalucía (2013-2016). *C. jejuni* isolated from humans have been previously characterized [16, 17]. Finally, the *Campylobacter* isolates from urban effluents (n=50; 4 *C. jejuni* and 45 *C. coli*) come from a wastewater treatment plant from a city in the centre of Spain (2011-2013) [18]. Isolates were not epidemiologically related. All isolates were identified by conventional multiplex PCR of the genus and specie of *Campylobacter* using specific primers to identify *C. jejuni* and *C. coli*, as described previously [19].

### **Antimicrobial susceptibility testing**

The antibiotic resistance profile of *Campylobacter* isolates from urban effluents was previously described [18]. The analysis of *Campylobacter* isolates of human origin was made following the same technique and against the same antibiotics that had been used in isolates from animals and urban effluents: ciprofloxacin, erythromycin, gentamicin, tetracycline, streptomycin and nalidixic acid. The susceptibility of *C. jejuni* isolates from humans has been previously measured against ciprofloxacin, erythromycin and gentamicin [16]. *Campylobacter* isolates were grown on blood agar plates (bioMérieux) and incubated for 48 h at 37°C at microaerophilic conditions (Oxoid). Collected cultures (standardized to 0.5 McFarland turbidity) were added 50 µL to 11 mL of Mueller-Hinton broth (TREK Diagnostics Systems, Waltham, MA, USA), and supplemented to 5.5% with lysed horse blood freshly prepared in house from horse blood (Oxoid). This mix was distributed onto EUCAMP2 microdilution plates (TREK Diagnostics Systems) and incubated under microaerophilic conditions for 48 h at 37 °C. The interpretation of the quantitative data was performed as described by the European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST [20].

### **DNA extraction and sequencing**

*Campylobacter* collection was stored at -80°C in 1% protease peptone and 10% glycerol broth. Isolates were subcultured onto blood agar plates (bioMérieux) in microaerophilic conditions using the atmosphere generation systema Campygen (Oxoid) at 42°C for 48 h. The genomic DNA was extracted from 1-day single-colony cultures incubated at 42°C using the QiaAMP DNA minikit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. DNA was quantified using a Nanodrop spectrophotometer before sequencing. High-throughput genome sequencing was performed using a HiSeq 2500 machine (Illumina) and the 100bp short read paired-end data was assembled using the *de novo* assembly algorithm within

SPAdes 3.1.1 [21]. The 252 *Campylobacter* sequenced genomes have showed an average of 200 contigs with a median value of 144 contigs.

### Genotype analysis

Genomes sequenced in this study were archived in the Bacterial Isolate Genome Sequence database (BIGSdb) [22]. The complete list of *Campylobacter* isolates used in this study as well as their BIGS ID are shown in **Table S1**. A gene-by-gene approach for genome alignment, identification of gene alleles and whole-genome MLST was done by BLAST algorithm [23, 24]. In order to identify the antimicrobial resistance genes, all *Campylobacter* genomes were confronted with The Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) [25].

**Table S1.** List of *Campylobacter* isolates used in this study.

| ZTA ID           | BIGS ID | Specie           | Source |
|------------------|---------|------------------|--------|
| ZTA11/03517-3CPF | 5049    | <i>C. jejuni</i> | Sewage |
| ZTA12/02041CASA  | 5055    | <i>C. jejuni</i> | Sewage |
| ZTA13/02371 CASA | 5077    | <i>C. jejuni</i> | Sewage |
| ZTA13/02382 CPF  | 5090    | <i>C. jejuni</i> | Sewage |
| ZTA13/00788 CP   | 5136    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00790 CP   | 5138    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00791 CP   | 5139    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00793 CP   | 5140    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00794 CP   | 5141    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00795 CP   | 5142    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00796 CP   | 5143    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00797 CP   | 5144    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00798 CP   | 5145    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00799 CP   | 5146    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00802 CP   | 5147    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00803 CP   | 5148    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00804 CP   | 5149    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00805 CP   | 5150    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00806 CP   | 5151    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00807 CP   | 5152    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00808 CP   | 5153    | <i>C. jejuni</i> | Human  |

**Table S1.** List of *Campylobacter* isolates used in this study.

| ZTA ID         | BIGS ID | Specie           | Source |
|----------------|---------|------------------|--------|
| ZTA13/00809 CP | 5154    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00810 CP | 5155    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00811 CP | 5156    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00812 CP | 5157    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00813 CP | 5158    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00815 CP | 5159    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00816 CP | 5160    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00817 CP | 5161    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00818 CP | 5162    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00819 CP | 5163    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00820 CP | 5164    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00821 CP | 5165    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00822 CP | 5166    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00823 CP | 5167    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00824 CP | 5168    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00825 CP | 5169    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00828 CP | 5172    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00829 CP | 5173    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00830 CP | 5174    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00831 CP | 5175    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00832 CP | 5176    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00833 CP | 5177    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00834 CP | 5178    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00836 CP | 5180    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00837 CP | 5181    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00838 CP | 5182    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00840 CP | 5183    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00841 CP | 5184    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00842 CP | 5185    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00843 CP | 5186    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00844 CP | 5187    | <i>C. jejuni</i> | Human  |

**Table S1.** List of *Campylobacter* isolates used in this study.

| ZTA ID         | BIGS ID | Specie           | Source |
|----------------|---------|------------------|--------|
| ZTA13/00845 CP | 5188    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00846 CP | 5189    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00847 CP | 5190    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00848 CP | 5191    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00849 CP | 5192    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00850 CP | 5193    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00851 CP | 5194    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00852 CP | 5195    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00853 CP | 5196    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00854 CP | 5197    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00855 CP | 5198    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00856 CP | 5199    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00857 CP | 5200    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00858 CP | 5201    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00859 CP | 5202    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00860 CP | 5203    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00861 CP | 5204    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00864 CP | 5205    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00865 CP | 5206    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00867 CP | 5208    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00868 CP | 5209    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00869 CP | 5210    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00870 CP | 5211    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00871 CP | 5212    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00872 CP | 5213    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| HU94           | 5215    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00873 CP | 5216    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00874 CP | 5217    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00875 CP | 5218    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00876 CP | 5219    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00877 CP | 5220    | <i>C. jejuni</i> | Human  |



**Table S1.** List of *Campylobacter* isolates used in this study.

| ZTA ID         | BIGS ID | Specie           | Source |
|----------------|---------|------------------|--------|
| ZTA13/00878 CP | 5221    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00879 CP | 5222    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00880 CP | 5223    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00881 CP | 5224    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00882 CP | 5225    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00883 CP | 5226    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00884 CP | 5227    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00885 CP | 5228    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00886 CP | 5229    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00887 CP | 5230    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00890 CP | 5233    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00891 CP | 5234    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00892 CP | 5235    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00894 CP | 5237    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00895 CP | 5238    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00896 CP | 5239    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00897 CP | 5240    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00899 CP | 5242    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00900 CP | 5243    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00902 CP | 5245    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00903 CP | 5246    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00904 CP | 5247    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00905 CP | 5248    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00906 CP | 5249    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00907 CP | 5250    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00908 CP | 5251    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00909 CP | 5252    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00910 CP | 5253    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00911 CP | 5254    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00912 CP | 5255    | <i>C. jejuni</i> | Human  |
| ZTA13/00913 CP | 5256    | <i>C. jejuni</i> | Human  |

**Table S1.** List of *Campylobacter* isolates used in this study.

| ZTA ID          | BIGS ID | Specie           | Source  |
|-----------------|---------|------------------|---------|
| ZTA13/00914 CP  | 5257    | <i>C. jejuni</i> | Human   |
| ZTA13/00915 CP  | 5258    | <i>C. jejuni</i> | Human   |
| ZTA13/00916 CP  | 5259    | <i>C. jejuni</i> | Human   |
| ZTA13/00917 CP  | 5260    | <i>C. jejuni</i> | Human   |
| ZTA13/00919 CP  | 5262    | <i>C. jejuni</i> | Human   |
| ZTA13/00920 CP  | 5263    | <i>C. jejuni</i> | Human   |
| ZTA10/00684 CPD | 5264    | <i>C. jejuni</i> | Broiler |
| ZTA10/01723 CPD | 5267    | <i>C. jejuni</i> | Broiler |
| ZTA10/00766 CPD | 5270    | <i>C. jejuni</i> | Broiler |
| ZTA10/01430 CPD | 5271    | <i>C. jejuni</i> | Broiler |
| ZTA10/00909 CPD | 5272    | <i>C. jejuni</i> | Broiler |
| ZTA10/02105 CPD | 5274    | <i>C. jejuni</i> | Broiler |
| ZTA10/02531 CPF | 5275    | <i>C. jejuni</i> | Broiler |
| ZTA10/02577 CPD | 5276    | <i>C. jejuni</i> | Broiler |
| ZTA10/01722 CPD | 5279    | <i>C. jejuni</i> | Broiler |
| ZTA10/02640 CPF | 5281    | <i>C. jejuni</i> | Broiler |
| ZTA10/01246 CPD | 5282    | <i>C. jejuni</i> | Broiler |
| ZTA10/02641 CPD | 5284    | <i>C. jejuni</i> | Broiler |
| ZTA11/01072 CP  | 5285    | <i>C. jejuni</i> | Broiler |
| ZTA11/01302 CP  | 5286    | <i>C. jejuni</i> | Broiler |
| ZTA11/01874 CP  | 5287    | <i>C. jejuni</i> | Broiler |
| ZTA11/02059 CP  | 5288    | <i>C. jejuni</i> | Broiler |
| ZTA11/02314 CP  | 5289    | <i>C. jejuni</i> | Broiler |
| ZTA11/03523 CP  | 5291    | <i>C. jejuni</i> | Broiler |
| ZTA10/01617 CPD | 5293    | <i>C. jejuni</i> | Cattle  |
| ZTA10/02583 CPF | 5295    | <i>C. jejuni</i> | Cattle  |
| ZTA10/00655 CPD | 5296    | <i>C. jejuni</i> | Cattle  |
| ZTA10/00681 CPD | 5297    | <i>C. jejuni</i> | Cattle  |
| ZTA10/00761 CPD | 5298    | <i>C. jejuni</i> | Cattle  |
| ZTA10/01043 CPD | 5299    | <i>C. jejuni</i> | Cattle  |
| ZTA10/01185 CPD | 5300    | <i>C. jejuni</i> | Cattle  |

**Table S1.** List of *Campylobacter* isolates used in this study.

| ZTA ID          | BIGS ID | Specie           | Source  |
|-----------------|---------|------------------|---------|
| ZTA10/01678 CPD | 5301    | <i>C. jejuni</i> | Cattle  |
| ZTA10/00700 CPD | 5302    | <i>C. jejuni</i> | Cattle  |
| ZTA10/00900 CPF | 5303    | <i>C. jejuni</i> | Cattle  |
| ZTA10/00951 CPD | 5304    | <i>C. jejuni</i> | Cattle  |
| ZTA10/01185 CPD | 5305    | <i>C. jejuni</i> | Cattle  |
| ZTA10/01333 CPD | 5306    | <i>C. jejuni</i> | Cattle  |
| ZTA10/01411 CPD | 5307    | <i>C. jejuni</i> | Cattle  |
| ZTA10/02289 CPD | 5308    | <i>C. jejuni</i> | Cattle  |
| ZTA10/02492 CPD | 5309    | <i>C. jejuni</i> | Cattle  |
| ZTA10/00575 CPD | 5311    | <i>C. jejuni</i> | Cattle  |
| ZTA11/00934 CP  | 5313    | <i>C. jejuni</i> | Cattle  |
| ZTA11/03537 CP  | 5316    | <i>C. jejuni</i> | Cattle  |
| ZTA11/03821 CP  | 5317    | <i>C. jejuni</i> | Cattle  |
| ZTA11/02705 CP  | 5318    | <i>C. jejuni</i> | Cattle  |
| ZTA11/01052 CP  | 5321    | <i>C. jejuni</i> | Cattle  |
| ZTA11/03823 CP  | 5322    | <i>C. jejuni</i> | Cattle  |
| ZTA11/02069 CP  | 5324    | <i>C. jejuni</i> | Cattle  |
| ZTA11/01530 CP  | 5325    | <i>C. jejuni</i> | Cattle  |
| ZTA11/01842 CP  | 5327    | <i>C. jejuni</i> | Cattle  |
| ZTA09/01326 CP  | 5124    | <i>C. coli</i>   | Broiler |
| VE08/01737 CP   | 5125    | <i>C. coli</i>   | Broiler |
| VE08/01742 CP   | 5126    | <i>C. coli</i>   | Broiler |
| ZTA11/01873 CP  | 5127    | <i>C. coli</i>   | Broiler |
| ZTA10/02488 CP  | 5128    | <i>C. coli</i>   | Broiler |
| ZTA11/01966 CP  | 5130    | <i>C. coli</i>   | Broiler |
| ZTA09/02553 CP  | 5133    | <i>C. coli</i>   | Broiler |
| ZTA10/00749 CPD | 5310    | <i>C. coli</i>   | Cattle  |
| ZTA16/00457 CP  | 5094    | <i>C. coli</i>   | Human   |
| ZTA16/00460 CP  | 5096    | <i>C. coli</i>   | Human   |
| ZTA16/00461 CP  | 5097    | <i>C. coli</i>   | Human   |
| ZTA16/00462 CP  | 5098    | <i>C. coli</i>   | Human   |

**Table S1.** List of *Campylobacter* isolates used in this study.

| ZTA ID         | BIGS ID | Specie         | Source |
|----------------|---------|----------------|--------|
| ZTA16/00463 CP | 5099    | <i>C. coli</i> | Human  |
| ZTA16/00465 CP | 5101    | <i>C. coli</i> | Human  |
| ZTA16/00466 CP | 5102    | <i>C. coli</i> | Human  |
| ZTA16/00467 CP | 5103    | <i>C. coli</i> | Human  |
| ZTA16/00468 CP | 5104    | <i>C. coli</i> | Human  |
| ZTA16/00469 CP | 5105    | <i>C. coli</i> | Human  |
| ZTA16/00470 CP | 5106    | <i>C. coli</i> | Human  |
| ZTA16/00471 CP | 5107    | <i>C. coli</i> | Human  |
| ZTA16/00472 CP | 5108    | <i>C. coli</i> | Human  |
| ZTA16/00474 CP | 5109    | <i>C. coli</i> | Human  |
| ZTA16/00475 CP | 5110    | <i>C. coli</i> | Human  |
| ZTA16/00477 CP | 5112    | <i>C. coli</i> | Human  |
| ZTA16/00478 CP | 5113    | <i>C. coli</i> | Human  |
| ZTA16/00480 CP | 5114    | <i>C. coli</i> | Human  |
| ZTA16/00481 CP | 5115    | <i>C. coli</i> | Human  |
| ZTA16/00482 CP | 5116    | <i>C. coli</i> | Human  |
| ZTA16/00485 CP | 5117    | <i>C. coli</i> | Human  |
| ZTA16/00486 CP | 5118    | <i>C. coli</i> | Human  |
| ZTA16/00487 CP | 5119    | <i>C. coli</i> | Human  |
| ZTA16/00488 CP | 5120    | <i>C. coli</i> | Human  |
| ZTA16/00490 CP | 5122    | <i>C. coli</i> | Human  |
| ZTA16/00491 CP | 5123    | <i>C. coli</i> | Human  |
| ZTA13/00789 CP | 5137    | <i>C. coli</i> | Human  |
| ZTA13/00826 CP | 5170    | <i>C. coli</i> | Human  |
| ZTA13/00827 CP | 5171    | <i>C. coli</i> | Human  |
| ZTA13/00866 CP | 5207    | <i>C. coli</i> | Human  |
| ZTA13/00889 CP | 5231    | <i>C. coli</i> | Human  |
| ZTA13/00893 CP | 5236    | <i>C. coli</i> | Human  |
| ZTA13/00918 CP | 5261    | <i>C. coli</i> | Human  |
| ZTA09/02173 CP | 5129    | <i>C. coli</i> | Pig    |
| VE08/03191 CP  | 5131    | <i>C. coli</i> | Pig    |

**Table S1.** List of *Campylobacter* isolates used in this study.

| ZTA ID                       | BIGS ID | Specie         | Source |
|------------------------------|---------|----------------|--------|
| ZTA09/02282 CP               | 5132    | <i>C. coli</i> | Pig    |
| ZTA10/02396 CPFA Preston     | 5040    | <i>C. coli</i> | Sewage |
| ZTA11/00429 CPD Preston      | 5041    | <i>C. coli</i> | Sewage |
| ZTA11/01227 CPF Preston      | 5042    | <i>C. coli</i> | Sewage |
| ZTA11/01965 CPD Preston      | 5043    | <i>C. coli</i> | Sewage |
| ZTA11/01965 CPF Preston      | 5044    | <i>C. coli</i> | Sewage |
| ZTA11/02394 CPD Preston      | 5045    | <i>C. coli</i> | Sewage |
| ZTA11/02394 CPF Preston      | 5046    | <i>C. coli</i> | Sewage |
| ZTA11/03024-2 CPF Preston    | 5047    | <i>C. coli</i> | Sewage |
| ZTA11/03517-3 CPD Preston    | 5048    | <i>C. coli</i> | Sewage |
| ZTA11/03517-4 CPF Preston    | 5050    | <i>C. coli</i> | Sewage |
| ZTA12/00985 CPF Preston F    | 5051    | <i>C. coli</i> | Sewage |
| ZTA12/01820 CPDA Preston     | 5052    | <i>C. coli</i> | Sewage |
| ZTA12/01820 CPFA Preston     | 5053    | <i>C. coli</i> | Sewage |
| ZTA12/01820 CPFB Preston     | 5054    | <i>C. coli</i> | Sewage |
| ZTA12/02041 CASA A Preston   | 5056    | <i>C. coli</i> | Sewage |
| ZTA12/02041 CASA A Preston F | 5057    | <i>C. coli</i> | Sewage |
| ZTA12/02041 CASA B Preston   | 5058    | <i>C. coli</i> | Sewage |
| ZTA12/02041 CASA B Preston F | 5059    | <i>C. coli</i> | Sewage |
| ZTA12/02041 CASA C Preston F | 5061    | <i>C. coli</i> | Sewage |
| ZTA12/02041 CPFA Preston F   | 5062    | <i>C. coli</i> | Sewage |
| ZTA12/02041 CPFB Preston F   | 5063    | <i>C. coli</i> | Sewage |
| ZTA12/02464 CASA Bolton      | 5064    | <i>C. coli</i> | Sewage |
| ZTA12/02464 CASA A Preston   | 5065    | <i>C. coli</i> | Sewage |
| ZTA12/02464 CPD Preston      | 5066    | <i>C. coli</i> | Sewage |
| ZTA12/02464 CPFA Preston     | 5067    | <i>C. coli</i> | Sewage |
| ZTA12/02579 CASA F           | 5068    | <i>C. coli</i> | Sewage |
| ZTA12/02579 CPD Preston      | 5069    | <i>C. coli</i> | Sewage |
| ZTA12/02579 CPD Preston F    | 5070    | <i>C. coli</i> | Sewage |
| ZTA12/02785 CASA F           | 5072    | <i>C. coli</i> | Sewage |
| ZTA12/02785 CASA Preston     | 5073    | <i>C. coli</i> | Sewage |

**Table S1.** List of *Campylobacter* isolates used in this study.

| ZTA ID                      | BIGS ID | Specie         | Source |
|-----------------------------|---------|----------------|--------|
| ZTA12/02785 CPD Preston     | 5075    | <i>C. coli</i> | Sewage |
| ZTA12/02785 CPF Preston     | 5076    | <i>C. coli</i> | Sewage |
| ZTA13/02371 CASA Preston    | 5078    | <i>C. coli</i> | Sewage |
| ZTA13/02372 CASA F          | 5079    | <i>C. coli</i> | Sewage |
| ZTA13/02375 CASA            | 5080    | <i>C. coli</i> | Sewage |
| ZTA13/02376 CASA Bolton     | 5081    | <i>C. coli</i> | Sewage |
| ZTA13/02377 CASA Preston    | 5082    | <i>C. coli</i> | Sewage |
| ZTA13/02378 CASA Preston    | 5083    | <i>C. coli</i> | Sewage |
| ZTA13/02380 CASA Preston F  | 5084    | <i>C. coli</i> | Sewage |
| ZTA13/02381 CASA Preston F  | 5085    | <i>C. coli</i> | Sewage |
| ZTA13/02382 CASA            | 5086    | <i>C. coli</i> | Sewage |
| ZTA13/02382 CASA F B        | 5088    | <i>C. coli</i> | Sewage |
| ZTA13/02382 CASA Preston F  | 5089    | <i>C. coli</i> | Sewage |
| ZTA13/02383 CASA Preston    | 5091    | <i>C. coli</i> | Sewage |
| ZTA13/02387 CA+B61:B255SA F | 5092    | <i>C. coli</i> | Sewage |

## Results

### Antibiotic resistance profile of *Campylobacter* isolates.

The collection of this study consists of *Campylobacter* isolates of animal, human and sewage origin. Isolates of animal origin have been selected according to their antibiotics resistances (**Table 1**) to compare the mechanisms of antimicrobial resistance detected in them with those present in isolates from humans and sewage. *Campylobacter* isolates of animal origin belong to the VAV Network and were selected according to their antibiotic resistance profile since their susceptibility to ciprofloxacin, erythromycin, gentamicin, tetracycline, streptomycin and nalidixic acid is known. Antibiotic resistance profiles from *Campylobacter* isolates are shown in **Table 1**. Combined resistance to nalidixic acid and ciprofloxacin were observed in both *Campylobacter* species, therefore we will refer to them as resistance to ciprofloxacin only.

The resistance percentages of *C. jejuni* and *C. coli* isolates for each antibiotic tested were, respectively, as follows: ciprofloxacin, 91.6 and 92.5; tetracycline,

94.1 and 93.8; erythromycin, 0.8 and 17.5; streptomycin, 6.7 and 60; gentamicin, 1.7 and 6.3. Higher prevalence of resistance was observed in *C. coli* for erythromycin, streptomycin and gentamicin. Moreover, 4 of the 116 *C. jejuni* isolates (3.4%) were susceptible to all antibiotics tested, whereas any *C. coli* susceptible to less than 2 antibiotics was found. The main resistance profile detected in *C. jejuni* isolated from both humans and sewage is CT whereas in *C. coli* are CT and CTS, without significant differences for both origins (**Table 1**).

According to the EFSA criteria, an isolate resistant to at least three classes of antibiotics can be classified as multidrug resistant [26]. Following this, multiresistant isolates were less frequent in *C. jejuni* (9.24%) than in *C. coli* (56.25%).

**Table 1.** Drug resistance profiles found among 253 *Campylobacter* isolates from animals, humans and sewage.

| Profile <sup>1</sup> | <i>C. jejuni</i> <sup>2</sup> |           |        | <i>C. coli</i> <sup>2</sup> |           |           |
|----------------------|-------------------------------|-----------|--------|-----------------------------|-----------|-----------|
|                      | Animals                       | Humans    | Sewage | Animals                     | Humans    | Sewage    |
| <b>CTESG</b>         |                               |           |        | 4 (36.4)                    | 1 (3)     |           |
| <b>CTES</b>          |                               |           | 1 (25) | 5 (45.5)                    | 4 (12.1)  | 5 (10.6)  |
| <b>CTSG</b>          |                               | 2 (1.7)   |        |                             | 1 (3)     | 3 (6.4)   |
| <b>CTS</b>           | 15 (34.1)                     | 7 (6.9)   |        | 1 (9.1)                     | 11 (33.3) | 17 (36.2) |
| <b>CTE</b>           | 3 (6.8)                       | 1 (0.9)   |        | 1 (9.1)                     | 1 (3)     | 2 (4.3)   |
| <b>CT</b>            | 16 (36.4)                     | 95 (82.6) | 2 (50) |                             | 12 (36.4) | 13 (27.7) |
| <b>TS</b>            |                               |           |        |                             | 1 (3)     | 4 (8.5)   |
| <b>C</b>             | 3 (6.8)                       | 1 (0.9)   | 1 (25) |                             | 2 (6.1)   | 1 (2.1)   |
| <b>T</b>             | 5 (11.4)                      | 5 (4.4)   |        |                             |           |           |
| <b>Sensitive</b>     | 2 (4.5)                       | 4 (3.5)   |        |                             |           |           |
| <b>TOTAL</b>         | 44                            | 115       | 4      | 11                          | 33        | 45        |

<sup>1</sup>Antibiotic resistance: C, chloramphenicol; T, tetracycline; E, erythromycin; S, streptomycin; G, gentamicin. <sup>2</sup>Total number of isolates (% upon species and origin).

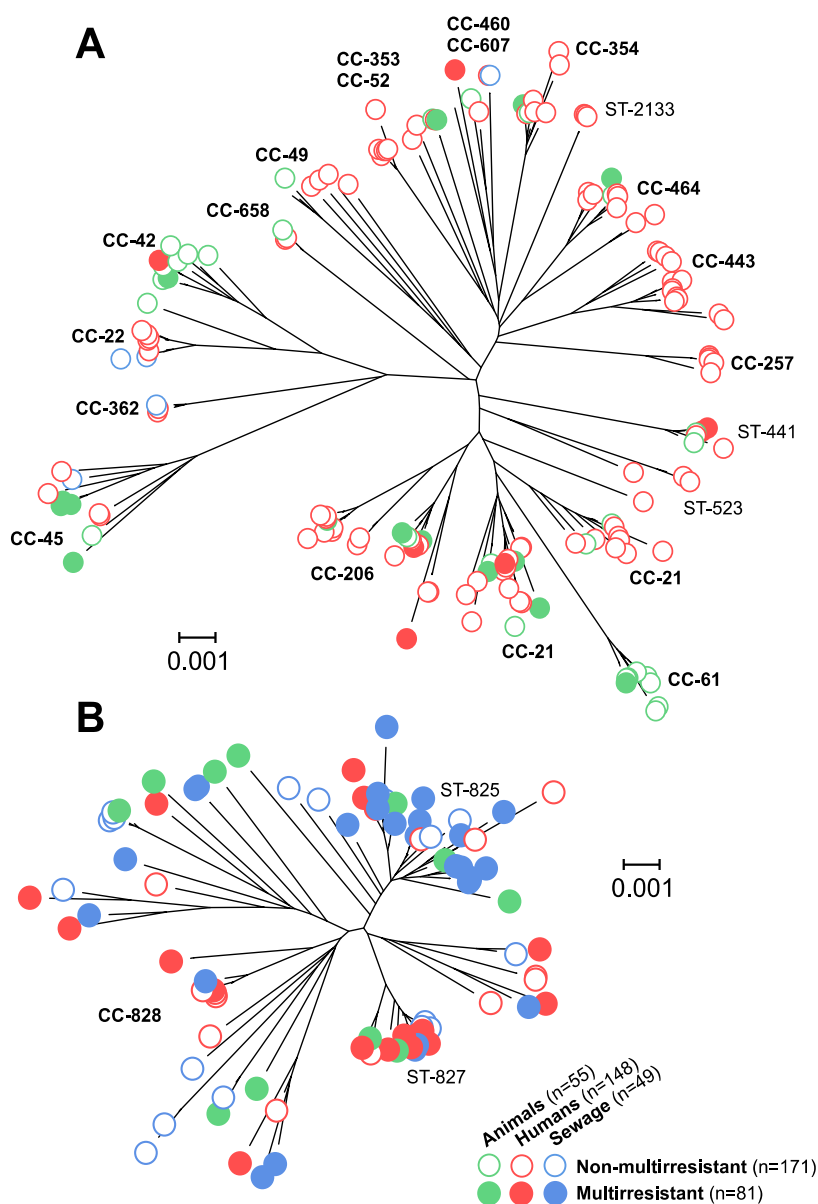
### Population structure of *Campylobacter* isolates.

A core genome tree was implemented to compare the population structure of *C. jejuni* and *C. coli* isolates of this study (**Figure 1**). In addition, the multiresistant or non-multiresistant condition for each isolate is shown. Isolates of *C. jejuni* from food animals belong to clonal complexes CC-61 (n=8), CC-21 (n=7), CC-42 (n=7), CC-45 (n=6), CC-206 (n=4), CC-464 (n=2), CC-354 (n=2), CC-52 (n=2),

CC-658 (n=1) and CC-607 (n=1). Isolates of *C. jejuni* from human infections belong to CC-21 (n=22), CC-206 (n=15), CC-443 (n=12), CC-353 (n=8), CC-464 (n=7), CC-22 (n=6), CC-354 (n=6), CC-658 (n=5), CC-257 (n=5), CC-45 (n=4), CC-607 (n=2), CC-362 (n=2), CC-48 (n=2), CC-42 (n=1), CC-52 (n=1), CC-574 (n=1), CC-446 (n=1), CC-49 (n=1) and CC-460 (n=1). *C. jejuni* isolated from urban effluents belong to CC-22 (n=2), CC-45 (n=1), ST-607 (n=1) and CC-362 (n=1). Multiresistant isolates of *C. jejuni* are located in different clonal complexes throughout the tree (**Figure 1**). In the case of *C. coli* isolates, 28 different sequence types (ST) have been identified and all belong to CC-828.

The majority sequence types (ST) in *C. coli* were ST-825 (19/92; 20.65%) and ST-827 (16/92; 17.39%). Most of the *C. coli* isolates from ST-825 are from sewage (12/19; 63.16%) and those from ST-827 are mostly from humans (8/16; 50%). The 65.71% of *C. coli* isolates from both ST-825 and ST-827 were considered as multiresistance (23/35) (**Figure 1**). The distribution of multiresistant isolates following the population structure of *C. jejuni* and *C. coli* is shown in **Figure 1**. The diversity of sequence types from the *Campylobacter* collection used in this study is available (**Table 2**).





**Figure 1.** Genetic structure of *C. jejuni* (A) and *C. coli* (B) isolates. NJ Tree on core genome (595 genes). The bar-scale represents the number of substitutions per site. Numeric labels correspond to clonal complexes (CC). *Campylobacter* isolates resistant to at least three classes of antibiotics are considered as multiresistant.

**Table 2.** Clonal complexes (CC) and sequence types (ST) of the *Campylobacter* isolates analysed in this study.

| <b><i>C. jejuni</i> (N=163)</b> |         |  |
|---------------------------------|---------|--|
| CC                              | ST      | No. of isolates (%)                            |
| <b>CC-21</b>                    | ST-19   | 1 Human (0.6), 1 Cattle (0.6)                  |
|                                 | ST-21   | 9 Human (5.5), 4 Cattle (2.5), 1 Broiler (0.6) |
|                                 | ST-47   | 1 Human (0.6)                                  |
|                                 | ST-50   | 4 Human (2.4), 1 Cattle (0.6)                  |
|                                 | ST-53   | 4 Human (2.4)                                  |
|                                 | ST-883  | 1 Human (0.6)                                  |
|                                 | ST-3769 | 2 Human (1.2)                                  |
| <b>CC-206</b>                   | ST-46   | 1 Human (0.6)                                  |
|                                 | ST-122  | 5 Human (3.1), 2 Cattle (1.2)                  |
|                                 | ST-227  | 1 Human (0.6), 1 Cattle (0.6)                  |
|                                 | ST-572  | 7 Human (4.3), 1 Broiler (0.6)                 |
|                                 | ST-2112 | 1 Human (0.6)                                  |
| <b>CC-443</b>                   | ST-51   | 4 Human (2.4)                                  |
|                                 | ST-440  | 1 Human (0.6)                                  |
|                                 | ST-443  | 3 Human (1.8)                                  |
|                                 | ST-772  | 1 Human (0.6)                                  |
|                                 | ST-859  | 1 Human (0.6)                                  |
|                                 | ST-2928 | 1 Human (0.6)                                  |
|                                 | Unknown | 2 Human (1.2)                                  |
| <b>CC-45</b>                    | ST-45   | 2 Broiler (1.2)                                |
|                                 | ST-137  | 3 Broiler (1.8)                                |
|                                 | ST-233  | 2 Human (1.2)                                  |
|                                 | ST-538  | 1 Human (0.6)                                  |
|                                 | ST-583  | 1 Human (0.6)                                  |
|                                 | ST-2109 | 1 Sewage (0.6)                                 |
| <b>CC-464</b>                   | ST-464  | 7 Human (4.3), 1 Broiler (0.6), 1 Cattle (0.6) |
| <b>CC-353</b>                   | ST-5    | 2 Human (1.2)                                  |
|                                 | ST-356  | 6 Human (3.7)                                  |
| <b>CC-354</b>                   | ST-354  | 6 Human (3.7), 1 Broiler (0.6), 1 Cattle (0.6) |
| <b>CC-42</b>                    | ST-42   | 3 Cattle (1.8)                                 |
|                                 | ST-469  | 1 Human (0.6), 1 Broiler (0.6)                 |
|                                 | ST-575  | 1 Cattle (0.6)                                 |
|                                 | ST-4016 | 1 Broiler (0.6), 1 Cattle (0.6)                |

**Table 2.** Clonal complexes (CC) and sequence types (ST) of the *Campylobacter* isolates analysed in this study.

| <b><i>C. jejuni</i> (N=163)</b> |         |  |
|---------------------------------|---------|--|
| CC                              | ST      | No. of isolates (%)                            |
| <b>CC-61</b>                    | ST-61   | 8 Cattle (4.9)                                 |
| <b>CC-22</b>                    | ST-22   | 6 Human (3.7), 2 Sewage (1.2)                  |
| <b>CC-658</b>                   | ST-523  | 2 Human (1.2)                                  |
|                                 | ST-1044 | 2 Human (1.2), 1 Broiler (0.6)                 |
|                                 | ST-2180 | 1 Human (0.6)                                  |
| <b>CC-257</b>                   | ST-257  | 1 Human (0.6)                                  |
|                                 | ST-990  | 4 Human (2.4)                                  |
| <b>CC-607</b>                   | ST-607  | 1 Human (0.6)                                  |
|                                 | ST-1707 | 1 Human (0.6), 1 Sewage (0.6)                  |
|                                 | ST-7110 | 1 Broiler (0.6)                                |
| <b>CC-362</b>                   | ST-2123 | 2 Human (1.2), 1 Sewage (0.6)                  |
| <b>CC-52</b>                    | ST-52   | 1 Human (0.6), 1 Broiler (0.6), 1 Cattle (0.6) |
| <b>CC-48</b>                    | ST-48   | 2 Human (1.2)                                  |
| <b>CC-460</b>                   | ST-2844 | 1 Human (0.6)                                  |
| <b>CC-49</b>                    | ST-49   | 1 Human (0.6)                                  |
| <b>CC-446</b>                   | ST-450  | 1 Human (0.6)                                  |
| <b>CC-574</b>                   | ST-305  | 1 Human (0.6)                                  |
| Unknown                         | ST-441  | 4 Human (2.4), 1 Cattle (0.6), 1 Broiler (0.6) |
|                                 | ST-531  | 2 Human (1.2)                                  |
|                                 | ST-2133 | 3 Human (1.8)                                  |
|                                 | ST-457  | 1 Human (0.6)                                  |
|                                 | ST-586  | 1 Cattle (0.6)                                 |
|                                 | ST-1710 | 1 Broiler (0.6)                                |
|                                 | ST-2274 | 1 Human (0.6)                                  |
|                                 | ST-2324 | 1 Human (0.6)                                  |
|                                 | ST-3030 | 1 Broiler (0.6)                                |
| <b><i>C. coli</i> (N=89)</b>    |         |  |
| CC                              | ST      | No. of isolates (%)                            |
| <b>CC-828</b>                   | ST-825  | 19 Sewage (11.7)                               |
|                                 | ST-826  | 1 Sewage (1.1)                                 |
|                                 | ST-827  | 16 Sewage (18)                                 |
|                                 | ST-829  | 5 Sewage (5.6)                                 |
|                                 | ST-830  | 2 Sewage (2.2)                                 |

**Table 2.** Clonal complexes (CC) and sequence types (ST) of the *Campylobacter* isolates analysed in this study.

| <i>C. jejuni</i> (N=163) |         |                                |
|--------------------------|---------|--------------------------------|
| CC                       | ST      | No. of isolates (%)            |
|                          | ST-832  | 1 Sewage (1.1)                 |
|                          | ST-854  | 2 Sewage (2.2)                 |
|                          | ST-860  | 1 Sewage (1.1), 2 Human (2.2)  |
|                          | ST-872  | 2 Human (2.2)                  |
|                          | ST-887  | 2 Human (2.2)                  |
|                          | ST-894  | 2 Human (2.2)                  |
|                          | ST-899  | 3 Human (3.4)                  |
|                          | ST-901  | 1 Human (1.1)                  |
|                          | ST-902  | 2 Human (2.2)                  |
|                          | ST-962  | 1 Human (1.1)                  |
|                          | ST-1055 | 6 Human (6.7)                  |
|                          | ST-1107 | 1 Human (1.1)                  |
|                          | ST-1112 | 1 Human (1.1)                  |
|                          | ST-1556 | 1 Human (1.1)                  |
|                          | ST-1666 | 2 Human (2.2)                  |
|                          | ST-2077 | 1 Human (1.1), 1 Broiler (1.1) |
|                          | ST-2097 | 4 Broiler (4.5), 1 Pig (1.1)   |
|                          | ST-2741 | 1 Broiler (1.1)                |
|                          | ST-3017 | 2 Pig (2.2)                    |
|                          | ST-3020 | 1 Human (1.1), 1 Pig (1.1)     |
|                          | ST-3246 | 1 Human (1.1)                  |
|                          | ST-5659 | 3 Human (3.4)                  |
|                          | ST-7622 | 1 Human (1.1)                  |

### Antibiotic resistance genes present in multiresistant *Campylobacter* isolates.

In order to identify the antibiotic resistance genes present in *Campylobacter*, the genomes sequenced in this study were compared with The Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARDdb) [25]. **Table 3** shows the antibiotic resistance genes identified in *Campylobacter* pooled into multiresistant and non-multiresistant isolates from animals, humans and sewage.

The presence of the genes *ant(6)-Ib*, *sat-4*, *ant-like*, *ant(6)-Ia*, *aad9*, *sat-1*, *aph(2)-IIIa*, *aph(3)-IIIa*, *lnuC* and *hyg* is associated with multiresistant isolates ( $p<0.001$ ). In the case of *apr* and *erm(B)* genes there is no significance because of the low number of positive isolates. Multiresistant and non-multiresistant *Campylobacter* isolates show significant differences in the antimicrobial resistance genetic profile according to the origin, except for the *blaOXA-61* and *ant-like* gene. The *blaOXA-61* gene is more prevalent in *C. jejuni* than in *C. coli* (108/168; 64.3% and 47/92; 51.09% respectively) ( $p<0.05$ ). Multiresistant *Campylobacter* isolates shown different presence of the *blaOXA-61* gene according to the origin ( $p<0.05$ ). This gene is more prevalent in animal isolates (25/28; 89.23%) than in those from humans (15/25; 60%) or from sewage (9/27; 33.33%). The *ant-like* gene is more prevalent in *C. coli* than in *C. jejuni* (38/92; 41% and 2/168; 1.2% respectively) ( $p<0.001$ ). The presence of the *ant-like* gene is different depending on the animal, human or residual water source in both resistant ( $p<0.05$ ) and non-resistant *Campylobacter* isolates ( $p<0.01$ ). In the case of non-multiresistant isolates, the frequency difference of the *ant-like* is probably because most of the human isolates are *C. jejuni* and those from sewage are *C. coli*.

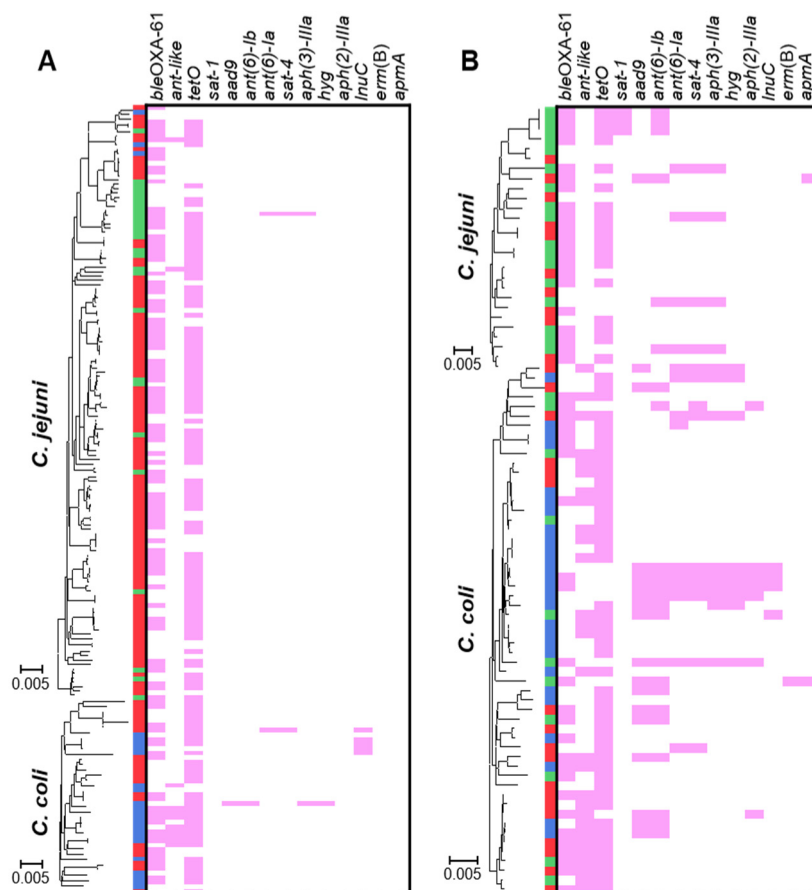
**Table 3.** Percentage of *Campylobacter* isolates carrying each antibiotic resistance gene.

| Genes              | No. Isolates multiresistant <sup>1</sup> (%) |                  |                  | No. Isolates non-multiresistant <sup>2</sup> (%) |                   |                  |
|--------------------|--|------------------|------------------|--|-------------------|------------------|
|                    | Animals<br>(n=28)                            | Humans<br>(n=25) | Sewage<br>(n=27) | Animals<br>(n=27)                                | Humans<br>(n=121) | Sewage<br>(n=28) |
| <i>bla</i> OXA-61  | 25 (89.28)                                   | 13 (50)          | 9 (33.33)        | 17 (62.96)                                       | 76 (62.81)        | 14 (50)          |
| <i>tetO</i>        | 21 (75)                                      | 19 (76)          | 23 (85.19)       | 21 (77.78)                                       | 91 (75.21)        | 17 (60.71)       |
| <i>ant-like</i>    | 5 (17.86)                                    | 12 (48)          | 11 (40.74)       | 1 (3.7)  | 1 (0.83)          | 8 (28.57)        |
| <i>ant(6)-Ia</i>   | 5 (17.85)                                    | 3 (12)           | 6 (22.22)        | 1 (3.7)  | 1 (0.83)          |                  |
| <i>sat-4</i>       | 6 (21.43)                                    | 3 (12)           | 5 (18.51)        | 1 (3.7)  | 1 (0.83)          |                  |
| <i>lnuC</i>        | 1 (3.57)                                     |                  | 3 (11.11)        |  | 1 (0.83)          | 4 (14.29)        |
| <i>ant(6)-Ib</i>   | 10 (35.71)                                   | 5 (20)           | 8 (29.63)        |  |                   |                  |
| <i>aad9</i>        | 4 (14.29)                                    | 6 (24)           | 8 (29.63)        |  |                   |                  |
| <i>aph(3)-IIIa</i> | 1 (3.57)                                     | 2 (8)            | 3 (11.11)        |  |                   |                  |
| <i>aph(2)-IIIa</i> | 2 (7.14)                                     | 1 (4)            | 4 (14.81)        |  |                   |                  |
| <i>hyg</i>         | 1 (3.57)                                     | 2 (8)            | 6 (22.22)        |  |                   |                  |
| <i>apr</i>         | 1 (3.57)                                     | 1 (4)            |                  |  |                   |                  |
| <i>sat-1</i>       | 3 (10.71)                                    |                  |                  |  |                   |                  |
| <i>erm(B)</i>      | 1 (3.57)                                     |                  |                  |  |                   |                  |

<sup>1</sup>Isolates resistant to at least three classes of antibiotics.

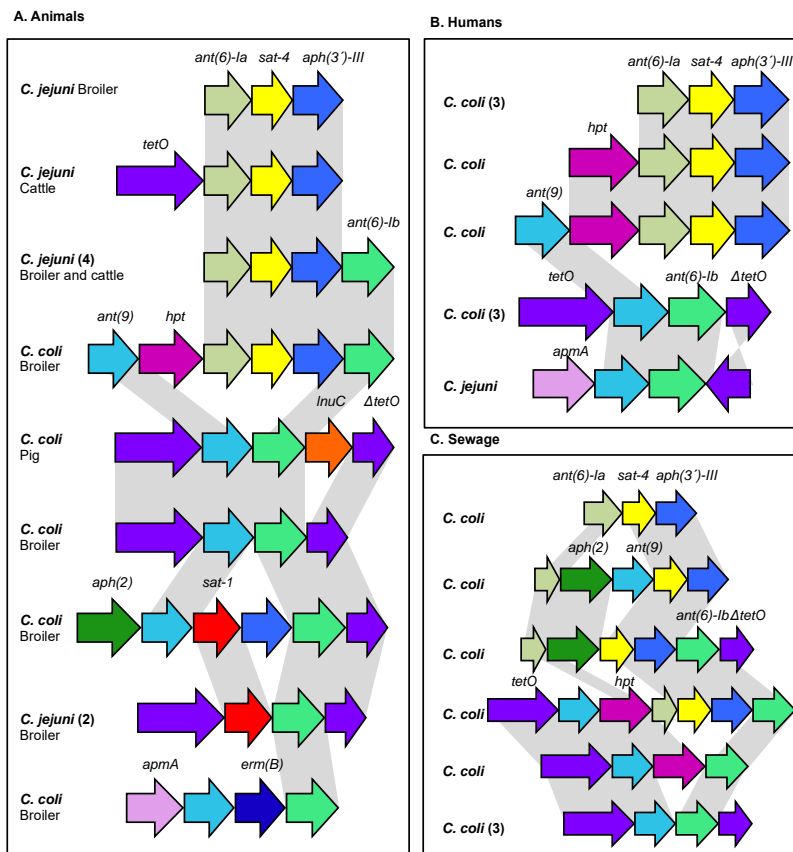
<sup>2</sup>Isolates susceptible to less than three classes of antibiotics.

With the aim of identifying possible multiresistance genomic islands, the antibiotic resistance genes identified in each isolate are shown in **Figure 2**. In section B of Figure 2, it is shown that there are associations of some antibiotic resistance genes with others, which could suppose the insertion of these genes in genomic islands of multi-resistance. The genomic islands identified in this study are shown in **Figure 3**.



**Figure 2.** Antimicrobial resistance genes identified in *Campylobacter* isolates. The output has been grouped in non-multiresistant (A) and multiresistant *Campylobacter* isolates (B). The presence of the antimicrobial resistance gene is represented by a pink label. Isolates from animals are represented by green (A: n=27 and B: n=28), humans by red (A: n=121 and B: n=25) and sewage by blue (A: n=28 and B: n=27). The bar represents the number of substitutions per site.

Two types of genetic associations in the genomic islands were identified and both are repeated in isolated from animals, humans and residual water. First, the association between genes *ant(6)-la*, *sat-4* and *aph(3)-III*, which is further increased by *aph(2)* and *ant9* in the sewage isolates. Second, an association of genes *tetO*, *ant(9)* and *ant(6)-lb* was also evidenced (**Figure 3**).



**Figure 3.** Schematic view of multidrug-resistant genomic islands identified in *Campylobacter* isolates from animals (A), humans (B) and sewage (C). The grey shading indicates regions sharing > 95% DNA identity. Each gene is identified with a different color.

#### Identical alleles of antibiotic resistance genes present in *C. jejuni* and *C. coli*.

In order to identify the possible horizontal transfer of antibiotic resistance genes between *C. jejuni* and *C. coli*, the allelic diversity of the resistance genes have been analysed. Identical alleles were identified in both species of the antimicrobial resistance genes *blaOXA-61*, *tetO*, *ant(6)-la*, *ant(6)-lb* and *sat-4*. The *blaOXA-61* gene presents a diversity of 35 different alleles and two of them are detected in both species, one of these in 16 *C. coli* and 49 *C. jejuni* isolates



and the other in 5 *C. coli* and 4 *C. jejuni*. The *tetO* gene presents the highest allelic diversity, with 48 identified different alleles, with only two identified in both *Campylobacter* species. The major *tetO* allele was present in 34 *C. coli* and 25 *C. jejuni*, whereas the minor one exists in 2 *C. coli* and 26 *C. jejuni* isolates. Two of the ten alleles identified in the *ant(6)-Ia* gene are present in both species, with 6 *C. coli* and 3 *C. jejuni* isolates in one case and 3 *C. coli* and 3 *C. jejuni* in the other. Only one out of the 3 alleles identified for the *ant(6)-Ib* gene was located in 14 *C. coli* and 5 *C. jejuni*. Finally the *sat-4* gene shares five different alleles among which two were identified in both species of *Campylobacter*, including 4 *C. coli* and 3 *C. jejuni* isolates in one case and 2 *C. coli* and 1 *C. jejuni* in the other. Beside this, any association could be found between particular alleles and the origin (animals, humans or wastewater) of isolates.

### Discussion

There are currently 700,000 annual deaths from antibiotic-resistant bacterial infections and if no action is taken, this number can increase to 10 million by 2050 [27]. We are currently experiencing a crisis because of resistance to antibiotics since human infections caused by bacteria resistant to all available antibiotics have been reported. The World Health Organization (WHO) has published this year a list of antibiotic-resistant "priority pathogens", which includes the 12 families of bacteria most dangerous to human health and *Campylobacter* is one of them [13]. Being the main cause of gastroenteritis in humans and possessing multiresistance genomic islands makes the genus *Campylobacter* a priority in terms of public health [26]. It has been identified in isolates from China and recently in Europe that the genomic islands of multiresistance present in *Campylobacter* also carry the gene of resistance to erythromycin, drug of choice against infections probed by this bacterium [11, 12]. The aim of this work was to identify which antibiotic resistance genes are present in *Campylobacter* and to know their potential genetic mechanisms of transmission in isolates from animals, humans and wastewater.

Antibiotics in human and veterinary medicine act as a selective agent for bacteria resistant to these drugs and may cause mechanisms of resistance to be transmitted to other commensal bacteria [28]. Farm residues such as manure or human wastewater can cause antibiotic-resistant bacterial isolates to be transferred into the environment [29]. For all this, the first objective of this study was to compare the resistance phenotypes between animal, human and sewage

isolates. To simplify the analysis and following the EFSA criteria, we have considered each *Campylobacter* isolate to be multiresistant if it shows resistant to three or more classes of antibiotics, or not multiresistant. Most isolates of *C. coli* are multiresistant (62%) whereas in the case of *C. jejuni* they are a minority (18%). These results are in line with those published in the last EFSA report, where the presence of isolates resistant to four classes of antibiotics was higher in *C. coli* (1 isolate in Portugal, 3 in France and 5 in Spain) than in *C. jejuni* (1 isolate in France and 2 in Spain) isolates from humans [26]. According with our results, the great difference between the multiresistant isolates of *C. coli* and *C. jejuni* is the presence of resistance to aminoglycosides (streptomycin and gentamicin).

Resistance to aminoglycosides is mainly due to enzymes that modify the antibiotic and in the case of *Campylobacter* the genes encoding these enzymes are usually associated in genomic islands [9-12]. These genomic islands carry several genes of resistance to antibiotics, mainly aminoglycosides, and they have the capacity to be transferred from one cell to another [9, 10]. As the results of the present work show, the number of multiresistance genomic islands identified in *C. coli* (n=21) has been much higher than those identified in *C. jejuni* (n=9). This may be due to lower horizontal gene transfer in *C. jejuni* isolates than in *C. coli* by barriers such as *C. jejuni* CRISPR-Cas system [30].

The entire *Campylobacter* isolate collection of this study has been characterized by the MLST technique and the four major CCs were CC-21, CC-206, CC-443, CC-45 and CC-464. It is well known that the clonal complexes CC-21 mainly and CC-45 are the most distributed in humans, animals and even food of animal origin or water [6, 31, 32]. The CC-443 is also considered to be one of the most prevalent in *C. jejuni* isolated from humans, standing out in Mediterranean countries like Italy, Croatia and now Spain [33-35]. The clonal complex CC-464 was first identified in a human isolate from Japan in 2001 and since then its prevalence in *Campylobacter* isolated from animals and humans have been growing [4, 36, 37]. The population structure of *C. coli* is very different from that of *C. jejuni* since it only has two clonal complexes [38]. All *C. coli* isolates identified in the present study belonged to the major clonal complex of this species, CC-828. Lineages CC-828 and CC-1150 form the two CCs identified in *Campylobacter coli* and both are part of one of the three clades within this species [38].

The next objective of this study was to identify which antibiotic resistance genes were present in *Campylobacter* and to evaluate if there was association between these genes and the level of multiresistance, as well as the origin of isolation. In this study the following antibiotic resistance genes have been identified: *bla*OXA-61, *tetO*, *ant-like*, *ant(6)-Ia*, *sat-4*, *lnuC*, *ant(6)-Ib*, *aad9*, *aph(3)-IIIa*, *aph(2)-IIIa*, *hyg*, *apr*, *sat-1* and *erm(B)*. There were no significant differences between the percentage of multiresistant and non multiresistant isolates carrying the *bla*OXA-61 and *tetO* genes. The gene *bla*OXA-61 is associated with ampicillin, amoxicillin, penicillin and ticarcillin resistance and its prevalence in *Campylobacter* is as high as to consider most of the isolates of this genus resistant to beta-lactams, except carbapenems [39, 40]. In this work the susceptibility of *Campylobacter* isolates to beta lactam antibiotics has not been evaluated. The presence of the *tetO* gene in the two groups of *Campylobacter* isolates (multiresistant or not) is due to its widespread distribution in this genus, which produces very high levels of resistance [26, 41, 42]. The high prevalence of *tetO* gene in *Campylobacter* is explained because its transfer does not require selective pressure [43].

Genes that offer resistance to aminoglycosides (apramycin, streptomycin, lincomycin, spectinomycin, streptothricin, kanamycin, neomycin, amikacin and gentamycin) and macrolides have been identified in this study. Recently, the World Health Organization (WHO) has reported the urgent need to identify new antibiotics against several pathogens, including *Campylobacter* [13]. In vitro tests have shown gentamicin as a possible treatment against campylobacteriosis produced by macrolide resistant bacteria [44]. In the present study, the gene for resistance to gentamicin *aph(2)-III* in *C. coli* isolated from animals and sewage has been identified. Since the first identification of the *aph(2)* gene in *Campylobacter* isolates the report of resistance to gentamicin in this bacterium has increased considerably and different variants of this gene have been identified in isolates from humans, animals and foods of animal origin [9, 45-47]. In Europe, the *aph(2)* gene has been identified in *Campylobacter* isolated from turkeys and chickens of Spanish origin, both works belonging to this doctoral thesis.

All genes identified in this study, except *bla*OXA-61 and *ant-like*, have been identified in genomic islands of multiresistance. The association of antibiotic resistance genes in a cluster in *Campylobacter* is known, being first identified in *Campylobacter* isolated from chickens in China [9]. Aminoglycoside resistance

genes were identified together, but a few years later, also in isolates of Chinese origin, genomic islands were identified with aminoglycoside and macrolide resistance genes [10]. In addition it has been proven that there is horizontal transfer of these genomic islands between different species of *Campylobacter*, which could imply a potential route of antibiotic-resistance transmission [11]. In the present work multiresistance genomic islands have been identified in *Campylobacter* isolates from animals, humans and sewage, which implies an active transfer of antimicrobial-resistance genes in *Campylobacter*. Comparing all these sequences, we can see two clusters of genes that could be transferred together, on the one hand the cluster and on the other hand. Cluster *ant(6)-Ia*, *sat-4* and *aph(3)-IIIa* have been previously identified in Gram-positive bacteria such as *Staphylococcus* [48] and, following the genetic structure of these sequences in *Campylobacter*, it could have been inserted in cluster *tetO*, *aad9* and *ant(6)-Ib*.

One way to analyse the horizontal transfer between bacterial species is to compare the allelic sequences of certain genes [49]. The gene-flow between *C. jejuni* and *C. coli* is known, it is even said that we are facing a process of convergence between both species [8]. In order to evaluate the possible gene transfer of antibiotic resistance we have sought identical alleles of these genes. Identical alleles of *blaOXA-61*, *tetO*, *ant(6)-Ia*, *ant(6)-Ib* and *sat-4* genes have been identified in *C. jejuni* and *C. coli* isolates, which could indicate a recent genetic exchange event. The exchange of these genes between both species of *Campylobacter* could help maintain antibiotic resistance genes in animals, humans and sewage. Wastewater contains traces of antibiotics, which could favour the selection of resistant bacteria [50]. Although there is controversy on this issue, part of the scientific community consider wastewater treatment plants as a possible route of transmission of antibiotic resistance to the environment [29, 51]. This work evidences the presence of *Campylobacter* isolated from wastewater carriers of genomic islands of multiresistance. This finding shows how the dispersion of antibiotic resistance develops from a one-health perspective in the bacterium that produces the largest number of food infections in the European Union.

## References

1. (EFSA), E.F.S.A., The trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne

outbreaks in 2015. EFSA Journal, 2016. 14(12): p. 231.

2. Kaakoush, N.O., et al., Global Epidemiology of *Campylobacter* Infection. Clin Microbiol Rev, 2015. 28(3): p. 687-720.

3. Coker, A.O., et al., Human campylobacteriosis in developing countries. Emerg Infect Dis, 2002. 8(3): p. 237-44.

4. Wang, X., et al., Antimicrobial resistance and molecular subtyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from retail meats. J Food Prot, 2011. 74(4): p. 616-21.

5. Amadi, V.A., et al., *Campylobacter* Species Isolated from pigs in Grenada exhibited novel clones: genotypes and antimicrobial resistance profiles of sequence types. Foodborne Pathog Dis, 2017.

6. Levesque, S., et al., Multilocus sequence typing of *Campylobacter jejuni* isolates from humans, chickens, raw milk, and environmental water in Quebec, Canada. J Clin Microbiol, 2008. 46(10): p. 3404-11.

7. Allos, B.M., *Campylobacter jejuni* Infections: update on emerging issues and trends. Clin Infect Dis, 2001. 32(8): p. 1201-6.

8. Sheppard, S.K., et al., Convergence of *Campylobacter* species: implications for bacterial evolution. Science, 2008. 320(5873): p. 237-9.

9. Qin, S., et al., Identification of a novel genomic island conferring resistance to multiple aminoglycoside antibiotics in

*Campylobacter coli*. Antimicrob Agents Chemother, 2012. 56(10): p. 5332-9.

10. Qin, S., et al., Report of ribosomal RNA methylase gene *erm(B)* in multidrug-resistant *Campylobacter coli*. J Antimicrob Chemother, 2014. 69(4): p. 964-8.

11. Wang, Y., et al., Emergence of multidrug-resistant *Campylobacter* species isolates with a horizontally acquired rRNA methylase. Antimicrob Agents Chemother, 2014. 58(9): p. 5405-12.

12. Florez-Cuadrado, D., et al., Description of an *erm(B)*-carrying *Campylobacter coli* isolate in Europe. J Antimicrob Chemother, 2016. 71(3): p. 841-3.

13. WHO, World Health Organization. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. 2017.

14. Queenan, K., B. Hasler, and J. Rushton, A One Health approach to antimicrobial resistance surveillance: is there a business case for it? Int J Antimicrob Agents, 2016. 48(4): p. 422-7.

15. Moreno, M.A., et al., Antibiotic resistance monitoring: the Spanish programme. The VAV Network. Red de Vigilancia de Resistencias Antibioticas en Bacterias de Origen Veterinario. Int J Antimicrob Agents, 2000. 14(4): p. 285-90.

16. Hormeño, L., et al., Identification of the main quinolone resistance determinant in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by MAMA-DEG PCR. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2016. 84(3): p. 236-239.

17. Hormeño, L. Tesis Doctoral: Resistencia frente a los antimicrobianos de mayor interés clínico en cepas de "*Campylobacter*" aisladas del hombre y los animales. Universidad de Extremadura, 2016.
18. Ugarte-Ruiz, M., et al., Method comparison for enhanced recovery, isolation and qualitative detection of *C. jejuni* and *C. coli* from wastewater effluent samples. Int J Environ Res Public Health, 2015. 12(3): p. 2749-64.
19. Ugarte-Ruiz, M., et al., Evaluation of four protocols for the detection and isolation of thermophilic *Campylobacter* from different matrices. J Appl Microbiol, 2012. 113(1): p. 200-8.
20. Cuenca-Estrella, M., et al., Correlation between the procedure for antifungal susceptibility testing for *Candida* spp. of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing (EUCAST) and four commercial techniques. Clin Microbiol Infect, 2005. 11(6): p. 486-92.
21. Bankevich, A., et al., SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. J Comput Biol, 2012. 19(5): p. 455-77.
22. Jolley, K.A. and M.C. Maiden, BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. BMC Bioinformatics, 2010. 11: p. 595.
23. Sheppard, S.K., K.A. Jolley, and M.C. Maiden, A gene-by-gene approach to bacterial population genomics: whole genome MLST of *Campylobacter*. genes (Basel), 2012. 3(2): p. 261-77.
24. Maiden, M.C., et al., MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. Nat Rev Microbiol, 2013. 11(10): p. 728-36.
25. Jia, B., et al., CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. Nucleic Acids Res, 2017. 45(D1): p. D566-D573.
26. EFSA, The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2015. EFSA Journal, 2017. 15(2): p. 212.
27. O'Neil, J. Review on Antimicrobial Resistance, Tackling drug-resistant infections globally. 2016. Wellcome Trust and HM Government.
28. Cheng, A.C., et al., Control of fluoroquinolone resistance through successful regulation, Australia. Emerg Infect Dis, 2012. 18(9): p. 1453-60.
29. Rizzo, L., et al., Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. Sci Total Environ, 2013. 447: p. 345-60.
30. Gardner, S.P. and J.W. Olson, Barriers to Horizontal Gene Transfer in *Campylobacter jejuni*. Adv Appl Microbiol, 2012. 79: p. 19-42.
31. Dingle, K.E., et al., Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. J Clin Microbiol, 2001. 39(1): p. 14-23.
32. Dearlove, B.L., et al., Rapid host switching in generalist *Campylobacter* strains erodes the

signal for tracing human infections. ISME J, 2016. 10(3): p. 721-9.

33. Cody, A.J., et al., Wild bird-associated *Campylobacter jejuni* isolates are a consistent source of human disease, in Oxfordshire, United Kingdom. Environ Microbiol Rep, 2015. 7(5): p. 782-8.

34. Piccirillo, A., et al., Multilocus sequence typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from humans and chickens in North-Eastern Italy. New Microbiol, 2014. 37(4): p. 557-62.

35. Mikulic, M., et al., Prevalence of Thermotolerant *Campylobacter* spp. in chicken meat in Croatia and multilocus sequence typing of a small subset of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates. Food Technol Biotechnol, 2016. 54(4): p. 475-481.

36. Cody, A.J., et al., A longitudinal 6-year study of the molecular epidemiology of clinical *campylobacter* isolates in Oxfordshire, United kingdom. J Clin Microbiol, 2012. 50(10): p. 3193-201.

37. Zhang, M., et al., Molecular typing and antimicrobial susceptibility profiles of *Campylobacter jejuni* isolates from north China. J Med Microbiol, 2010. 59(Pt 10): p. 1171-7.

38. Sheppard, S.K. and M.C. Maiden, The evolution of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015. 7(8): p. a018119.

39. Tajada, P., et al., Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter jejuni* and

*Campylobacter coli* to 12 beta-lactam agents and combinations with beta-lactamase inhibitors. Antimicrob Agents Chemother, 1996. 40(8): p. 1924-5.

40. Sykes, R.B. and M. Matthew, The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to beta-lactam antibiotics. J Antimicrob Chemother, 1976. 2(2): p. 115-57.

41. Connell, S.R., et al., Mechanism of Tet(O)-mediated tetracycline resistance. EMBO J, 2003. 22(4): p. 945-53.

42. Taylor, D.E. and P. Courvalin, Mechanisms of antibiotic resistance in *Campylobacter* species. Antimicrob Agents Chemother, 1988. 32(8): p. 1107-12.

43. Avrain, L., C. Vernozy-Rozand, and I. Kempf, Evidence for natural horizontal transfer of tetO gene between *Campylobacter jejuni* strains in chickens. J Appl Microbiol, 2004. 97(1): p. 134-40.

44. Lehtopolku, M., et al., Antimicrobial susceptibilities of multidrug-resistant *Campylobacter jejuni* and *C. coli* strains: in vitro activities of 20 antimicrobial agents. Antimicrob Agents Chemother, 2010. 54(3): p. 1232-6.

45. Toth, M., et al., Novel aminoglycoside 2"-phosphotransferase identified in a gram-negative pathogen. Antimicrob Agents Chemother, 2013. 57(1): p. 452-7.

46. Chen, Y., et al., Whole-genome sequencing of gentamicin-resistant *Campylobacter coli* isolated from U.S. retail meats reveals novel plasmid-mediated aminoglycoside resistance genes.

Antimicrob Agents Chemother, 2013. 57(11): p. 5398-405.

47. Yao, H., et al., High Prevalence and Predominance of the *aph(2'')*-I<sub>f</sub> gene conferring aminoglycoside resistance in *Campylobacter*. Antimicrob Agents Chemother, 2017. 61(5).

48. Werner, G., B. Hildebrandt, and W. Witte, Linkage of *erm(B)* and *aadE-sat4-aphA-3* in multiple-resistant *Enterococcus faecium* isolates of different ecological origins. Microb Drug Resist, 2003. 9 Suppl 1: p. S9-16.

49. Hanssen, A.M., G. Kjeldsen, and J.U. Sollid, Local variants of *Staphylococcal* cassette chromosome *mec* in sporadic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococci*: evidence of horizontal gene transfer? Antimicrob Agents Chemother, 2004. 48(1): p. 285-96.

50. Lupo, A., S. Coyne, and T.U. Berendonk, Origin and evolution of antibiotic resistance: the common mechanisms of emergence and spread in water bodies. Front Microbiol, 2012. 3: p. 18.

51. Munck, C., et al., Limited dissemination of the wastewater treatment plant core resistome. Nat Commun, 2015. 6: p. 8452.





## 7.DISCUSIÓN



Los microorganismos del género *Campylobacter*, especialmente *C. jejuni* y *C. coli*, son las bacterias que con mayor frecuencia causan infecciones alimentarias en personas de todo el mundo (51). La infección se atribuye principalmente al consumo de alimentos de origen animal, principalmente carne de pollo, y en menor medida al consumo de agua contaminada o al contacto con animales de granja (186, 187). La infección, conocida como campilobacteriosis, produce diarrea principalmente, por lo que su tratamiento se basa en la reposición de líquidos y electrolitos. Aunque esta infección suele ser auto-limitante, ocasionalmente puede requerir tratamiento antibiótico en pacientes inmunodeprimidos o ante infecciones extra intestinales, siendo el antibiótico de elección la eritromicina (48). En la presente tesis doctoral se ha caracterizado una colección de aislados de *C. jejuni* y *C. coli* procedentes de personas, animales y aguas residuales, con el objetivo de analizar sus mecanismos de resistencia a antimicrobianos, las estructuras genéticas que los contienen y los grupos filogenéticos a los que pertenecen.

### 7.1 Diversidad genética de *C. jejuni* y *C. coli*

La técnica de caracterización MLST ha permitido analizar la estructura poblacional de *C. jejuni* y *C. coli* y por tanto conocer en mayor profundidad la ecología de las especies bacterianas causantes de campilobacteriosis en personas. Desde el primer estudio de MLST en *C. jejuni* en el año 2001 en aislados del Reino Unido (66), muchos países han hecho estudios usando esta técnica. En la actualidad disponemos de bases de datos con información de los principales CCs y STs de *Campylobacter* identificadas en personas y animales principalmente, de diferentes continentes (<http://pubmlst.org/campylobacter/>) (Tabla 2 de la Introducción).

Durante el presente trabajo de investigación (capítulo 6.4) se han caracterizado por MLST un total de 252 *Campylobacter* aislados de animales de abasto (portadores), personas (casos clínicos) y aguas residuales (pretratamiento), todos ellos obtenidos en España. En los aislados de *C. jejuni* (n=163), los CCs mayoritarios han sido CC-21 (29/163; 18%), CC-206 (19/163; 12%), CC-443 (13/163; 8%), CC-45 (10/163; 6%) y CC-464 (9/163; 6%).

Se ha aislado *C. jejuni* CC-21 de personas (22/29; 76%) y animales (7/29; 24%), siendo una proporción considerable de los aislados de ganado bovino (6/7; 86%) y un único aislado de pollos (1/7; 14%). Aunque también se ha identificado en otros animales como el pollo (188), el CC-21 de *C. jejuni* es el más frecuentemente aislado de personas y ganado bovino, tanto en nuestro país (189), como a nivel internacional. Como vemos en la Tabla 2 de la Introducción (Capítulo 3.2.2.), este

CC es el más representado en personas y vacas procedentes de América, Europa y Oceanía. Pese a que el CC-21 de *C. jejuni* es el principal CC identificado en personas y ganado bovino, sólo el 10% de las infecciones humanas se atribuyen al consumo de productos derivados de vacuno (190). Parece evidente que *C. jejuni* CC-21 presenta ventajas de adaptación al ganado bovino, incluso ha sido un CC muy utilizado para estudiar la asociación a hospedador en *Campylobacter*. Se ha descrito como aislados de *C. jejuni* CC-21 se han especializado en la adaptación de ganado bovino exclusivamente, surgiendo así el CC-61 (62, 191). La caracterización genómica llevada a cabo en el estudio 4 de esta tesis doctoral (Capítulo 6.4) permite ver la asociación entre ambos CCs. Respecto a muestras de agua, no se han identificado *C. jejuni* CC-21 en efluentes urbanos, probablemente debido al reducido número de aislados de *C. jejuni* del que disponíamos. Un estudio llevado a cabo en diferentes tipos de muestras de agua procedentes del área Mediterránea de nuestro país, ha identificado *C. jejuni* CC-21 en efluentes urbanos y aguas residuales de granjas de pollos (192). Respecto al CC-206 nuestros resultados coinciden con la bibliografía, que lo relaciona con personas (15/19; 79%) y animales (4/19; 21%), principalmente bovino (189).

El CC-443, según nuestros resultados (13/13; 100%) y estudios previos, se asocia con *C. jejuni* aislados de personas (193-195) aunque también se ha descrito su presencia en muestras de carne de pollo procedentes de China (196) o Vietnam (197). El CC-443 de *C. jejuni* no es uno de los principales CCs causantes de infección en humanos a nivel global (Tabla 2 de la Introducción; pág. 39), quizás debido a que su presencia en Europa está asociada con países del mediterráneo como Italia (198), Croacia (199) y ahora España.

Aislados de *C. jejuni* CC-45, al igual que los del CC-21, también están distribuidos entre personas, animales y muestras ambientales (66, 190, 200). La mitad de los aislados de *C. jejuni* CC-45 de nuestro estudio proceden de animales (5/10; 50%), concretamente de pollos, mientras que el resto de aislados provienen de personas (4/10; 40%) o aguas residuales (1/10; 10%). Según nuestros resultados (Capítulo 6.4) y otros estudios basados en *C. jejuni* CC-45, parecería que éste CC está predominantemente asociado con animales, o al menos su relación con casos clínicos es menos frecuente que en el caso de *C. jejuni* CC-21 (189).

El último CC mayoritario de nuestro estudio ha sido CC-464 y se ha identificado principalmente en personas (7/9; 78%) seguido de dos aislados de animales (2/9; 12%), uno de pollo y otro de ganado bovino. Aislados de *C. jejuni* CC-464 se

identificaron por primera vez en un paciente afectado de campilobacteriosis de Japón en el año 2001 y desde entonces su presencia en animales y personas se ha mantenido e incluso se ha informado de un aumento en su frecuencia de detección (194, 201, 202).

La estructura de la población de *C. coli* es muy diferente de la de *C. jejuni*, se agrupan en tres clados o grupos filogenéticos distintos debido a que presenta una diversidad genética mucho menor entre sus aislados. Esta menor diversidad se ve reflejada en un reducido número de CCs, siendo dos los mayoritarios *C. coli* CC-828 y *C. coli* CC-1150 (203). Los aislados de *C. coli* CC-828 y CC-1150 se encuentran formando parte del clado 1, por lo que están relacionados genéticamente (204). Sin embargo, los clados 2 y 3 están formados por aislados de *C. coli* cuyas STs no están asignadas a ningún CC (204). Todos los aislados de *C. coli* identificados en esta tesis doctoral pertenecieron al CC-828 (89/89; 100%), lo que refleja una población homogénea, y no mostraron diferencias según la matriz u origen de la muestra.

Como vemos, determinados CCs tienen mayor frecuencia de detección que otros, lo que podría estar relacionado con que se trate de líneas genéticas que presenten ventajas de colonización respecto a los demás aislados. Es sabido que algunos aislados de *Campylobacter* presentan unos factores de colonización que otros aislados no poseen, lo que supondría una ventaja a la hora de sobrevivir en determinados ambientes (33, 205). Además se ha visto que ciertos factores de colonización, como el gen gamma glutamiltranspeptidasa (*ggt*), pueden estar asociados a un CC o ST determinado, lo que apoyaría la teoría de una mayor dispersión de ciertas líneas genéticas de *Campylobacter* (46, 206). Con el objetivo de identificar la diversidad genética presente en ciertos CCs de *Campylobacter*, en el presente trabajo de investigación (Capítulo 6.1) se analizó la presencia de este marcador genético (*ggt*) en una colección de aislados de *C. jejuni* pertenecientes a tres CCs asociados con casos clínicos: dos CCs ampliamente distribuidos en animales domésticos (CC-21 y CC-45) y un CC asociado a pollos, principal fuente de campilobacteriosis (CC-257).

Nuestros resultados coinciden con otros en los que el gen *ggt* estuvo asociado significativamente con el CC-45 y prácticamente fue ausente en aislados de *C. jejuni* CC-21 y CC-257 (46). Además del gen *ggt*, se identificaron otros factores de colonización, presentes sólo en determinadas cepas, en los aislados de *C. jejuni* ST-45: *ansB*<sup>s</sup>, *fucP* y *dmsA*. La diversidad de factores de colonización encontrada

en *C. jejuni* ST-45, podría explicar la ventaja que presenta este CC para colonizar diferentes nichos. Si recordamos los CCs mayoritarios de *C. jejuni* aislados de personas, veremos que CC-45 y CC-21 presentaban ciertas diferencias en cuanto a la frecuencia de detección según hospedador. Aislados de *C. jejuni* CC-45 están ampliamente distribuidos en animales domésticos y a este CC se le asocian los genes de colonización *ggt* y *ansB<sup>s</sup>* (206). En cambio, aislados de *C. jejuni* CC-21 se asocian principalmente con ganado bovino y en este caso el factor de colonización es el gen *fucP* (206).

Según nuestro estudio, parece que la capacidad de colonización de cada cepa de *C. jejuni* no se limita a la presencia de dos genes, sino que se han identificado cuatro genes que dan lugar a cinco perfiles metabólicos diferentes: (1) *ansB<sup>s</sup>* y *dmsA*, (2) *dmsA*, (3) *ggt*, *ansB<sup>s</sup>* y *dmsA*, (4) *ggt*, *ansB<sup>s</sup>* y *fucP* y (5) *ggt* y *ansB<sup>s</sup>*. En un estudio anterior (206), se identificaron tres perfiles diferentes en *C. jejuni* ST-45, ya que no se había evaluado la presencia de los genes *fucP* y *dmsA*. Nuestros resultados indicarían que la presencia de los genes *ggt*, *ansB<sup>s</sup>*, *dmsA* y *fucP* en aislados de *C. jejuni* CC-45 supondría una ventaja de colonización y explicaría la mayor dispersión de este CC.

### **7.2 Resistencia a macrólidos de *C. jejuni* y *C. coli***

Las campilobacteriosis, infecciones producidas principalmente por *C. jejuni* y *C. coli*, suelen ser auto-limitantes aunque en ocasiones precisan de antimicrobianos (23). El tratamiento está basado en fluoroquinolonas ó macrólidos, aunque el incremento de resistencias que presenta *Campylobacter* hacia la primera clase de antimicrobianos hace que los macrólidos sean el tratamiento de elección, concretamente eritromicina (207). Además, la infección tiene una alta frecuencia en niños de entre 1 y 4 años de edad y el uso de fluoroquinolonas en pacientes pediátricos puede estar limitado (51, 208).

Los estudios 2 y 3 de esta tesis doctoral (Capítulos 6.2 y 6.3) han estado enfocados en la caracterización de los mecanismos de resistencia a eritromicina, principalmente vinculados con genes de transferencia horizontal. A partir de una colección de aislados de *C. jejuni* y *C. coli* (procedentes de animales de abasto y aguas residuales), altamente resistentes a eritromicina (CMI > 32 mg/L), se evaluó de nuevo el nivel de resistencia a este antibiótico ampliando el rango de concentración empleada (0,5 – 1024 mg/L). La caracterización molecular de la resistencia a eritromicina se llevó a cabo analizando la presencia del gen *erm*(B) así como de mutaciones específicas en el gen 23S y en las proteínas ribosomales

L4 y L22. También se evaluó el efecto de las bombas de eflujo sobre la resistencia a macrólidos mediante el uso de un inhibidor de estas proteínas. No todos los datos de la caracterización de la resistencia a eritromicina han sido incluidos en los capítulos 8.2 y 8.3 (datos no publicados).

Los aislados procedentes de ganado bovino (n=11) y aguas residuales (n=14) mostraron niveles de resistencia a eritromicina más bajos (32-256 mg/L) que los aislados procedentes de pollos (n=29) o ganado porcino (n=34) (256-1024 mg/L). Esta diferencia podría deberse a que el número de aislados de *C. jejuni* en ganado bovino y aguas residuales era mayor que en ganado porcino o pollos de engorde aunque en general, los porcentajes de resistencias en bovino son menores que en porcino y pollos (209). Aparte de las diferencias entre hospedador, debido probablemente a la mayor presión selectiva por mayor uso de antimicrobianos (210), hay un efecto de especie ya que *C. jejuni* presenta fenotipos más sensibles que *C. coli* (121, 136, 183).

En cuanto a la caracterización molecular, el 65% de los aislados (58/88) mostraron como mecanismo de resistencia a eritromicina la mutación A2075G del gen 23S, conocido como el factor de resistencia a macrólidos más extendido en *Campylobacter* (134, 211-213). También se identificaron, en dos aislados de *C. coli*, otras mutaciones en el gen 23S capaces de generar altos niveles de resistencia a eritromicina (CMI > 1024 mg/L), concretamente A2074C y A2074G. La frecuencia de mutaciones en la posición 2074 es mucho menor que la de las mutaciones encontradas en la posición 2075 (211, 214). Polimorfismos en el nucleótido 2074 del gen 23S, podrían tener un efecto negativo sobre la tasa de crecimiento de la bacteria que lo porta, lo que explicaría la rara aparición de esta mutación en aislados de *Campylobacter* (211). Además, los dos aislados de *C. coli* que portan la mutación en la base 2074 no mostraron un aumento de susceptibilidad frente a eritromicina al inhibir las bombas de eflujo, lo que indicaría que la resistencia en este caso no se produce por un efecto sinérgico entre dos mecanismos. Nuestros resultados son coincidentes con otro estudio en el que un aislado de *C. jejuni* con una mutación en la base 2074 del gen 23S no modificó su resistencia a eritromicina al inhibir el efecto de las bombas de eflujo (143).

Por el contrario, aislados de *Campylobacter* con mutaciones en la base 2075 del gen 23S, si mostraron un efecto sinérgico con las bombas de eflujo y por tanto un aumento de la sensibilidad al inhibir el efecto de éstas (215). Otros autores han llevado a cabo estudios de coste biológico con el objetivo de conocer el efecto que



tienen estas mutaciones en las bacterias que las portan (113, 216). Aislados de *Campylobacter* con mutaciones en la posición 2074 o 2075 del gen 23S, mostraron tasas de crecimiento inferiores que aislados de tipo salvaje (113). Estos datos sugieren que en ausencia de antimicrobianos, las mutaciones que confieren resistencia a macrólidos hacen que *Campylobacter* se adapte peor a su hospedador natural (216).

El 33% (29/88) de los aislados resistentes a eritromicina no mostraron mutaciones en el gen 23S ni en las proteínas ribosomales L4 y L22, por lo que la resistencia en estos casos se asoció con otros mecanismos, como las bombas de eflujo (28/88). Este hecho fue probado ya que el uso del inhibidor de bombas de eflujo revertió la resistencia a eritromicina de todos los aislados (28/29). El aislado restante (1/29) presentó el gen *erm(B)* como mecanismos de resistencia a eritromicina. Las bombas de eflujo pueden generar resistencia a macrólidos en *Campylobacter* sin la ayuda o sinergia de otros mecanismos de resistencia como mutaciones del gen 23S (135). Respecto a las proteínas ribosomales L4 (gen *rplD*) y L22 (gen *rplV*), no se identificaron en ningún caso mutaciones o inserciones específicas a las que pudiera atribuirse el fenotipo de resistencia a eritromicina. Existen tres mutaciones descritas en *Campylobacter*, asociadas con la resistencia a macrólidos, para la proteína L4: G57A, G57V y G74A; en el caso del gen *rplV* (proteína L22), la resistencia parece estar relacionada con una inserción en la posición 86 o 98 (154, 217). Según la bibliografía y nuestros resultados, la resistencia a macrólidos es generalmente más prevalente en aislados de *C. coli* que en *C. jejuni*, lo que inicialmente sugeriría una mayor tasa de mutación. Sin embargo, hay datos que (aunque con un número limitado de aislados) no muestran diferencias significativas entre la frecuencia de mutación de ambas especies, lo que sugiere que *C. coli* no es más mutable que *C. jejuni* (218).

En esta tesis doctoral se ha identificado, por primera vez en Europa, el gen de resistencia a eritromicina *erm(B)* en *Campylobacter*. Concretamente se ha identificado en dos aislados de *C. coli* procedentes de pollos de engorde (capítulos 6.2 y 6.4) y en dos *C. coli* procedentes de pavos (capítulo 6.3). Al igual que en los *Campylobacter* aislados en China, el gen *erm(B)* se ha localizado en islas genómicas junto con otros genes de resistencia a antimicrobianos, concretamente aminoglucósidos (150, 151). La diversidad de islas genómicas de multirresistencia en *Campylobacter* se puso de manifiesto en un trabajo posterior donde, según el

contenido genético y los sitios de inserción en el cromosoma, se agruparon en seis tipos de secuencias (219).

En China se ha identificado el gen *erm*(B) en 57 *C. coli* y 1 *C. jejuni* aislados de personas y animales (patos, cerdos y pollos) y en todos los casos se localizaron en islas genómicas de multirresistencia. Nuestro estudio por tanto (capítulo 6.3) pone de manifiesto la presencia del gen *erm*(B) en *Campylobacter* aislados de pavos por vez primera. En China se identificaron seis tipos de islas genómicas en *C. coli* (I-VI): los tipos I y II se identificaron aislados de cerdos, el tipo III fue el más común y se identificó en personas y animales (pollo y pato) y los tipos IV, V y VI sólo se identificaron en *Campylobacter* aislados de personas (150). La isla genómica portadora del gen *erm*(B) identificada en *C. jejuni* en pollos de engorde (capítulo 6.2) se denominó como de tipo VII por presentar diferencias con las anteriormente identificadas (172).

En total, en España se han identificado cuatro aislados de *Campylobacter* portadores del gen *erm*(B) en una isla genómica de multirresistencia. Los cuatro aislados de *C. coli* positivos al gen *erm*(B) se aislaron de aves, dos de pollos y dos de pavos. En la producción de aves es común el uso de antimicrobianos y éstos pueden actuar como agentes de selección de microorganismos resistentes (220), favoreciendo así la selección de aislados portadores de genes de resistencia.

Las islas genómicas portadoras del gen *erm*(B) identificadas en esta tesis doctoral presentan una organización de los genes diferente a las descritas previamente. Los genes de resistencia a antimicrobianos presentes en las islas genómicas identificadas en *Campylobacter* son idénticos o casi idénticos (similitud >90%) a sus homólogos en bacterias grampositivas, lo que supondría un origen común (150). Es de sobra conocido que bacterias grampositivas como *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Staphylococcus* portan varios genes de resistencia a antimicrobianos (164, 221). Se considera que los genes de resistencia a antimicrobianos identificados en bacterias gramnegativas, como *E. coli*, *K. pneumoniae* o *Campylobacter* (164, 173, 221-223), provienen de bacterias grampositivas (219). Con el objetivo de analizar el posible origen del gen de resistencia a eritromicina en *Campylobacter*, se estudiaron las regiones de la primera isla genómica identificada en España y la diversidad alélica del gen *erm*(B).

La isla genómica identificada en el aislado *C. coli* ZTA09/02204 (capítulo 6.2) se dividió en tres regiones (regiones A, B y C) de acuerdo con el porcentaje de guanina

y citosina, y se estudió la homología de cada una de ellas. Así se vio que la región que porta el gen *erm*(B) (región B), presenta una identidad del 99% con *Eggerthella* sp. YY918 (AP012211), bacteria grampositiva. También muestra una similitud igual con la bacteria gramnegativa *Bacteroides uniformis* WH207 (AY345595). Ambas especies bacterianas, *Eggerthella* sp y *B. Uniformis*, forman parte de la microbiota intestinal, pudiendo así compartir nicho con *Campylobacter* y favorecerse el intercambio de ADN (224). Los *C. coli* aislados de pavos muestran diferencias respecto a *C. coli* ZTA09/02204 ya que no presentan región B. Uno de los aislados de pavos (*C. coli* ZTA14/01086), presenta las regiones A y C, mientras que el otro aislado (*C. coli* ZTA14/01426) en lugar de la región A posee los genes de resistencia a aminoglucósidos *aph*(2)-*IIIa* y *aph*(3)-*IIIa* (Figura 1; Capítulo 6.3).

En cuanto al estudio de comparación alélica de *erm*(B), se identificaron varias posibles rutas de transmisión. Por un lado, se identificaron alelos de *erm*(B) idénticos a los de *Campylobacter* en *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Peptoclostridium*, *Anaerostipes*, *Arcanobacterium*, *Eggerthella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Macrococcus* y *Selenomonas*, lo que sugiere su adquisición horizontal desde bacterias grampositivas, como se describió anteriormente (127, 150, 151). Los alelos del gen *erm*(B) identificados en esta tesis doctoral han sido previamente identificados principalmente en personas y patógenos bacterianos de ganado porcino (*Streptococcus suis*) procedentes de Asia y Europa. La bacteria *S. suis*, patógena oportunista para personas y ganado porcino, es considerada un reservorio de genes de resistencia a antimicrobianos (225, 226). En este microorganismo se han identificado elementos genéticos móviles portadores de genes de resistencia como *erm*(B), *tet*(O) y genes de resistencia a aminoglucósidos (227). Algunos autores advierten de que el uso de antimicrobianos combinados en granjas de cerdos podría seleccionar bacterias portadoras de mecanismos de resistencia frente a diferentes antimicrobianos (228).

Uno de los alelos de *erm*(B) identificados en el estudio 3 (alelo 2; capítulo 6.3) ha sido identificado en nueve géneros bacterianos, muy por encima de los alelos 1, 3 y 4 (5, 5 y 1 géneros bacterianos respectivamente). Todos los géneros bacterianos que se identificaron con el alelo 2 de *erm*(B) pertenecen al filo *Firmicutes*, excepto dos que son *Actinobacterias*. Estos géneros bacterianos están presentes en el tracto gastrointestinal por lo que comparten su nicho ecológico con *Campylobacter* (221). Se sabe que, la transferencia de genes de resistencia a antimicrobianos

entre bacterias de diferentes géneros, es una realidad en el tracto digestivo del hombre (229).

El hecho de haber detectado el gen de resistencia a eritromicina *erm*(B) en diferentes islas genómicas y con secuencias similares a las descritas en otros microorganismos, sugiere transferencia horizontal y da una idea de la gran diversidad genética y las posibilidades de diseminación de resistencias a varias clases de antimicrobianos debido a la asociación de los genes de resistencias en islas genómicas. El uso conjunto de eritromicina y lincosamida, tratamiento autorizado por la UE frente a micoplasmosis, salmonelosis y colibacilosis en pollos, podría ayudar a seleccionar aislados de *Campylobacter* portadores del gen *erm*(B) (230).

### 7.3 Genes de resistencia a antimicrobianos en *C. jejuni* y *C. coli*

En nuestro estudio, los porcentajes de resistencia de los aislados de *C. jejuni* (n=163) y *C. coli* (n=89) fueron los siguientes: ciprofloxacina (91,6 y 92,5), tetraciclina (94,1 y 93,8), eritromicina (0,8 y 17,5), estreptomina (6,7 y 60) y gentamicina (1,7 y 6,3). Se observó una mayor frecuencia de resistencia en *C. coli* para eritromicina, estreptomina y gentamicina. Además, 4 de los 163 aislamientos de *C. jejuni* (2,4%) fueron susceptibles a todos los antibióticos probados, mientras que ningún aislado de *C. coli* fue susceptible a menos de 2 antibióticos. El fenotipo de resistencia mayoritaria en *C. jejuni* ha sido CT (113/163; 69%) y principalmente se ha asociado con aislados procedentes de personas (95/115; 82%). En cambio, el fenotipo mayoritario en *C. coli* ha sido CTS (29/89; 33%), principalmente asociado con aislados de aguas residuales (17/29; 59%) y de personas (11/29; 38%). Respecto a la evolución de los fenotipos de resistencia, el reducido número de aislados de cada año (2008-2014) del que disponemos no permite hacer una evaluación en el tiempo.

La mayoría de aislados de *C. coli* fueron resistentes a tres o más clases de antimicrobianos (multirresistencia) mientras que en los aislados de *C. jejuni* fueron una minoría. Nuestros resultados coinciden con los publicados en el último informe de la EFSA, donde la presencia de aislados multiresistentes fue mayor en *C. coli* que en *C. jejuni* procedentes de personas (121). Datos de la UE del año 2015 muestran como el 15% de los aislados de *C. coli* procedentes de personas fueron susceptibles a todas las clases de antimicrobianos testados, mientras que en el caso de *C. jejuni* fue del 31,9%. El mismo estudio muestra como el 11,5% de los aislados de *C. coli* y el 8,7% de los aislados de *C. jejuni* procedentes de personas,

fueron multirresistentes. En cuanto al porcentaje de aislados multirresistentes hay gran variabilidad entre países ya que, en el caso de *C. coli* oscila entre el 5,1% en Austria y el 53,5% en Portugal (121).

Respecto a *Campylobacter* procedentes de animales, por ejemplo en pollos, se aprecia de nuevo la gran diferencia de porcentaje de aislados multirresistentes entre *C. coli* (18,3%) y *C. jejuni* (4,6%) (136). Para otros animales, como el ganado porcino y bovino, es difícil hacer la comparativa entre especies debido al reducido número de aislados de *C. jejuni* procedentes de cerdo o de *C. coli* procedentes de ganado bovino, como hemos citado anteriormente (Capítulo 3.2.3). En el caso del ganado porcino, el 19,5% de aislados de *C. coli* son multirresistentes (121), mientras que el porcentaje de aislados de *C. jejuni* procedentes de ganado bovino oscila entre el 2-7% (183). Los datos relativos a pavos muestran como entre el 1-8% de los aislados de *C. jejuni* son multirresistentes, en cambio el reducido número de países de la UE que han analizado aislados de *C. coli* (Alemania, España y Rumanía) no permite tener datos de esta especie (136). Como vemos, el porcentaje de *C. jejuni* aislados de personas y multirresistentes, es ligeramente superior a los datos encontrados en aislados de origen animal (pollos, ganado bovino y pavos). En cambio, para *C. coli*, el porcentaje de aislados multirresistentes procedentes de animales (pollos y cerdos) es superior a los aislados de personas. Esto podría estar asociado a la mayor frecuencia de infecciones de *C. jejuni* (90%) de personas respecto a *C. coli*, (alrededor del 10%) lo que haría que las cepas de *C. jejuni* estuvieran expuestas a una mayor fuerza selectiva por el uso de antimicrobianos en personas.

Los ambientes acuáticos están involucrados en la dispersión de bacterias multirresistentes y las aguas residuales pueden jugar un papel particularmente importante en estos procesos (231). Los valores de resistencia a antimicrobianos de aislados de *Campylobacter* procedentes de efluentes urbanos podrían considerarse como una aproximación del nivel de resistencia presentes en los habitantes de una determinada población (232). En cuanto a la dispersión de aislados multirresistentes de *Campylobacter*, se ha visto que hay grandes diferencias entre aguas residuales urbanas que contienen y no contienen subproductos de origen animal. Un estudio llevado a cabo en Países Bajos mostró como el 23% (10/44) de los aislados de *Campylobacter* procedentes de aguas residuales urbanas fueron multirresistentes, mientras que en aguas residuales

urbanas donde además se vertían subproductos de un matadero de pollos, el porcentaje fue del 35% (23/66).

Los aislados estudiados en esta tesis doctoral portaron los siguientes genes de resistencia a antimicrobianos: *bla*OXA-61, *tet*O, *ant-like*, *ant*(6)-Ia, *sat*-4, *lnu*C, *ant*(6)-Ib, *aad*9, *aph*(3)-IIIa, *aph*(2)-IIIa, *hyg*, *apr*, *sat*-1 y *erm*(B). Se han identificado genes que ofrecen resistencia a beta-lactámicos, tetraciclinas, aminoglucósidos (apramicina, estreptimicina, lincomicina, espectinomina, estreotricina, kanamicina, neomicina, ampicina y gentamicina) y macrólidos. No hubo diferencias significativas entre el porcentaje de aislados multirresistentes y no multirresistentes portadores de los genes *bla*OXA-61 y *tet*O. El gen *bla*OXA-61 está asociado con resistencia a ampicilina, amoxicilina, penicilina y ticarcilina y la frecuencia de este gen es tan alta en *Campylobacter* que la mayoría de aislados de este género son considerados resistentes a betalactámicos, excepto carbapenems (233, 234). En cuanto al gen de resistencia a tetraciclina *tet*(O), su presencia en los dos grupos de aislados de *Campylobacter* (multirresistentes y no multirresistentes) se debe a que está ampliamente distribuido en *Campylobacter*, dando lugar a un alto porcentaje de aislados resistentes (121, 235, 236). La alta frecuencia del gen *tet*(O) en *Campylobacter* se atribuye a que su mantenimiento y su transferencia no requiere de presión selectiva, como ha demostrado L. Avrain y colaboradores en estudios en pollos (237). En este estudio se inocularon pollos con un par de aislados de *C. jejuni*, una cepa resistente a tetraciclina y susceptible a ampicilina y otra con el fenotipo contrario. A continuación seleccionaron aislados resistentes a ambos antibióticos, los caracterizaron por RFLP y, mediante PCR, se identificó el gen *tet*(O) (237).

Un estudio ha evaluado la actividad de varios antimicrobianos contra *Campylobacter* y muestra a la gentamicina como posible tratamiento frente a campilobacteriosis provocadas por bacterias resistentes a macrólidos (238). En los estudios de esta tesis doctoral se ha identificado el gen de resistencia a gentamicina *aph*(2) en aislados de *C. coli* procedentes de animales de abasto y aguas residuales. Desde la primera identificación del gen *aph*(2) en aislados de *Campylobacter*, se han identificado diferentes variantes en aislados de este género procedentes de personas, animales y alimentos de China y Estados Unidos (169, 171, 239, 240). Los estudios de esta tesis doctoral ponen de manifiesto la presencia del gen *aph*(2) en aislados de *Campylobacter* procedentes en Europa.

Según nuestros resultados, la diferencia entre aislados multirresistentes y no multirresistentes, se debe a la resistencia a aminoglucósidos (gentamicina y estreptomicina). La resistencia a aminoglucósidos se produce principalmente por la presencia de enzimas que modifican el antibiótico y los genes que codifican estas proteínas están asociados con islas genómicas (127, 150, 151, 171). Nuestro resultados muestran como el número de islas genómicas de multirresistencia identificadas en *C. coli* ha sido mucho mayor que las identificadas en *C. jejuni*, al igual que ocurre en trabajos de China (150). La presencia de barreras, como el sistema CRISPR-Cas de *C. jejuni*, pueden dificultar la transferencia horizontal de genes en *C. jejuni* con respecto a *C. coli* (241). El sistema CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) es un sistema inmune procariótico que limita la captación de secuencias de ADN externas y por tanto confiere resistencia a agentes como plásmidos y fagos (242). Se encuentra en aproximadamente el 40% de los genomas bacterianos (243) y su presencia en *C. jejuni* y *C. coli* es muy diferente, siendo positivos prácticamente el 100% y menos del 10% de los aislados, respectivamente (244).

En el estudio cuatro (capítulo 6.4) se han identificado islas genómicas de multirresistencia en *Campylobacter* aislados de animales, personas y aguas residuales, lo que implica una posible dispersión de estos genes por transferencia horizontal. Comparando las asociaciones de unos genes de resistencia con otros, vemos que algunos se localizan en el mismo elemento genético y por tanto darían lugar a co-selección (245). La co-selección se produce cuando los genes que especifican fenotipos resistentes se encuentran juntos en un elemento genético móvil tal como un plásmido, un transposón o un integrón. El resultado final es el mismo: el desarrollo de resistencia a un agente antibacteriano se acompaña de la aparición de resistencia a otro agente (245). Es común encontrar en las islas genómicas de *Campylobacter* la secuencia correspondiente a los genes *ant(6)-Ia*, *sat-4* y *aph(3)-IIIa*, identificada previamente en bacterias grampositivas como *Staphylococcus* (246). Por otro lado, los genes *tet(O)*, *aad9* y *ant(6)-Ib* parece que también se localizan juntos en las islas genómicas de *Campylobacter*. La asociación entre los genes *tet* y *ant(6)-Ib* se ha descrito anteriormente en aislados de *Campylobacter fetus* y también se asociaron con islas genómicas (247). Según las secuencias identificadas en el estudio 4 (capítulo 6.4), parece que el triplete *ant(6)-Ia*, *sat-4* y *aph(3)-IIIa* se ha insertado en las islas genómicas junto a los genes *tet(O)*, *aad9* y *ant(6)-Ib*. Este hecho coincide con la teoría que dice que las islas genómicas tienen orígenes evolutivos paralelos y que se forman mediante una

asociación de módulos funcionales, en nuestro caso diferentes paquetes de genes de resistencia a antimicrobianos (248, 249).

Comparando las secuencias alélicas de ciertos genes podemos estudiar si han podido tener una evolución conjunta (250). El flujo de genes entre *C. jejuni* y *C. coli* es conocido y se cree que está dando lugar a un acercamiento genómico entre ambas especies (251). Se han identificado alelos idénticos en *C. jejuni* y *C. coli* de los siguientes genes: *blaOXA-61*, *tet(O)*, *ant(6)-Ib* y *sat-4*, lo que podría indicar un reciente intercambio genético (3, 59, 251). Las aguas residuales contienen trazas de antimicrobianos, lo que podría favorecer la selección de bacterias resistentes (252). Además, un nuevo estudio buscó genes de resistencia a los antibióticos en una cuenca de un río en España, revelando que las descargas de aguas residuales pueden promover la propagación de la resistencia a los antibióticos en arroyos y pequeños ríos (253). Aunque hay controversia y algunos autores dicen que la dispersión de resistencias a antimicrobianos por parte de las plantas de tratamiento de aguas residuales es muy limitado (254), varios autores consideran los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales como fuentes de antimicrobianos, genes de resistencia y bacterias resistentes al medio ambiente (252, 255, 256).





## **8.CONCLUSIONES**



- 1) La presencia del gen gamma-glutamyl transpeptidasa (*ggt*), está significativamente asociada a *C. jejuni* ST-45, lo que podría explicar la mayor diseminación de este ST.
- 2) En base al polimorfismo genético según los genes *ggt*, *ansB(s)*, *fucP* y *dmsA*, los aislados de *C. jejuni* ST-45 analizados presentan cinco perfiles metabólicos diferentes, lo que refleja la diversidad genética de *C. jejuni*.
- 3) El fenotipo de resistencia mayoritario en *C. jejuni* es ciprofloxacina y tetraciclina, mientras que en *C. coli* es ciprofloxacina, tetraciclina y estreptomicina. Además, se han identificado aislados de *C. coli* resistentes a todos los antimicrobianos analizados (ciprofloxacina, tetraciclina, eritromicina, estreptomicina y gentamicina) en pollos, cerdo y personas. Así, nuestros resultados muestran la mayor resistencia de *C. coli* respecto a *C. jejuni*.
- 4) El gen de resistencia a eritromicina *erm(B)* se ha identificado por primera vez en Europa en aislados de *C. coli* procedentes de pollos y pavos de España. La presencia del gen *erm(B)* en Europa y su localización en islas genómicas refleja la dispersión de este mecanismo de resistencia y su posible transferencia horizontal.
- 5) El gen de resistencia a gentamicina *aph(2)* se ha detectado en aislados de *C. coli* procedentes de pollos, pavos y aguas residuales, también asociado con islas genómicas de multirresistencia, lo que limitaría las posibles opciones terapéuticas frente a la campylobacteriosis.
- 6) Los *C. jejuni* aislados de personas en España pertenecen principalmente a los CC-21, CC-206 y CC-443, mientras que en el caso de *C. coli* todos pertenecieron al CC-828, habiéndose encontrado estos CCs en muestras de origen humano y animal (CC-21 y CC-206) o únicamente de personas (CC-443).
- 7) *C. jejuni* CC-21 se encuentra principalmente en personas y ganado bovino mientras que *C. jejuni* CC-61 se asocia exclusivamente con ganado bovino, lo que indicaría preferencia de hospedador de estos CCs.



## 9.CONCLUSIONS



- 1) The presence of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase (*ggt*) was significantly associated to *C. jejuni* ST-45, which could explain the wider spread of this ST.
- 2) The analysis of genetic polymorphisms of the genes *ggt*, *ansB(s)*, *fucP* y *dmsA* in isolates of *C. jejuni* ST-45 revealed the presence of five different metabolic profiles which reflect the broad genetic diversity of *C. jejuni*.
- 3) The most prevalent resistance phenotype identified among *C. jejuni* isolates was ciprofloxacin and tetracycline while the most prevalent one among *C. coli* isolates was ciprofloxacin, tetracycline and streptomycin. Various *C. coli* isolates originating from poultry, swine and humans were resistant to all the antimicrobials tested (ciprofloxacin, tetracycline, erythromycin, streptomycin and gentamicin). These evidence higher rates of resistance for *C. coli* isolates respect to *C. jejuni* isolates.
- 4) Gene *erm(B)*, that confers resistance to erythromycin, was identified for the first time in Europe in isolates of *C. coli* originating from broilers and turkeys from Spain. The presence of the *erm(B)* gene in Europe and its localization in genomic islands reflect the dissemination of this mechanism of resistance and its ability to be transferred horizontally.
- 5) The gentamycin resistance gene *aph(2)* was detected in isolates of *C. coli* originating from broilers, turkeys and sewage water. This gene was also located in multidrug resistance genomic islands. This fact could limit the therapeutic options in the treatment of campylobacteriosis.
- 6) The majority of human isolates of *C. jejuni* belonged to the clonal complexes CC-21, CC-206 and CC443. The first two (CC-21 and CC-206) were also found in animals while CC-443 was found exclusively in humans. On the other hand, all *C. coli* isolates belonged to CC-828.
- 7) *C. jejuni* CC-21 was mainly found in humans and bovines while *C. jejuni* CC-61 was associated exclusively with cattle which may indicate a possible host preference for these CCs.





## 10. BIBLIOGRAFIA



1. Cantas L, Suer K. Review: the important bacterial zoonoses in "one health" concept. *Frontiers in public health*. 2014;2:144.
2. Meng X, Wang Y, Wang Y, Chen B, Jing Z, Chen G, et al. OMS-2-Supported Cu Hydroxide-Catalyzed Benzoxazoles Synthesis from Catechols and Amines via Domino Oxidation Process at Room Temperature. *J Org Chem*. 2017.
3. Sheppard SK, Jolley KA, Maiden MC. A Gene-By-Gene Approach to Bacterial Population Genomics: Whole Genome MLST of *Campylobacter*. *Genes (Basel)*. 2012;3(2):261-77.
4. EFSA, EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2016. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2015. *EFSA Journal*. 2016;14(12):231.
5. Butzler JP. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. *Clin Microbiol Infect*. 2004;10(10):868-76.
6. Skirrow MB. John McFadyean and the centenary of the first isolation of *Campylobacter* species. *Clin Infect Dis*. 2006;43(9):1213-7.
7. Smith T, Taylor MS. Some morphological and biological characters of the Spirilla (*Vibrio Fetus*, N. Sp.) associated with disease of the fetal membranes in cattle. *J Exp Med*. 1919;30(4):299-311.
8. Lastovica A, S.W. On, and L. Zhang. The family *Campylobacteraceae*. The Prokaryotes, E Rosenber, et al, Editors 2014, Springer Berlin Heidelberg. 2014:307-35.
9. Levy AJ. A gastro-enteritis outbreak probably due to a bovine strain of vibrio. *Yale J Biol Med*. 1946;18:243-58.
10. Gilbreath JJ, Cody WL, Merrell DS, Hendrixson DR. Change is good: variations in common biological mechanisms in the epsilonproteobacterial genera *Campylobacter* and *Helicobacter*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2011;75(1):84-132.

11. Silva J, Leite D, Fernandes M, Mena C, Gibbs PA, Teixeira P. *Campylobacter* spp. as a Foodborne Pathogen: A Review. *Front Microbiol.* 2011;2:200.
12. Chynoweth RW, Hudson JA, Thom K. Aerobic growth and survival of *Campylobacter jejuni* in food and stream water. *Lett Appl Microbiol.* 1998;27(6):341-4.
13. Park SF. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. *Int J Food Microbiol.* 2002;74(3):177-88.
14. Corry JE, Post DE, Colin P, Laisney MJ. Culture media for the isolation of *Campylobacter*. *Int J Food Microbiol.* 1995;26(1):43-76.
15. Baylis CL, MacPhee S, Martin KW, Humphrey TJ, Betts RP. Comparison of three enrichment media for the isolation of *Campylobacter* spp. from foods. *J Appl Microbiol.* 2000;89(5):884-91.
16. Parkhill J, Wren BW, Mungall K, Ketley JM, Churcher C, Basham D, et al. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature.* 2000;403(6770):665-8.
17. Christie PJ, Vogel JP. Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol.* 2000;8(8):354-60.
18. Bacon DJ, Alm RA, Hu L, Hickey TE, Ewing CP, Batchelor RA, et al. DNA sequence and mutational analyses of the pVir plasmid of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Infect Immun.* 2002;70(11):6242-50.
19. Batchelor RA, Pearson BM, Friis LM, Guerry P, Wells JM. Nucleotide sequences and comparison of two large conjugative plasmids from different *Campylobacter* species. *Microbiology.* 2004;150(Pt 10):3507-17.
20. Alfredson DA, Korolik V. Sequence analysis of a cryptic plasmid pCJ419 from *Campylobacter jejuni* and construction of an *Escherichia coli*-*Campylobacter* shuttle vector. *Plasmid.* 2003;50(2):152-60.

21. Land M, Hauser L, Jun SR, Nookaew I, Leuze MR, Ahn TH, et al. Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. *Funct Integr Genomics*. 2015;15(2):141-61.
22. Jolley KA, Maiden MC. BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC bioinformatics*. 2010;11:595.
23. Epps SV, Harvey RB, Hume ME, Phillips TD, Anderson RC, Nisbet DJ. Foodborne *Campylobacter*: infections, metabolism, pathogenesis and reservoirs. *International journal of environmental research and public health*. 2013;10(12):6292-304.
24. Velayudhan J, Kelly DJ. Analysis of gluconeogenic and anaplerotic enzymes in *Campylobacter jejuni*: an essential role for phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Microbiology (Reading, England)*. 2002;148(Pt 3):685-94.
25. Barnes IH, Bagnall MC, Browning DD, Thompson SA, Manning G, Newell DG. Gamma-glutamyl transpeptidase has a role in the persistent colonization of the avian gut by *Campylobacter jejuni*. *Microb Pathog*. 2007;43(5-6):198-207.
26. Guccione E, Leon-Kempis Mdel R, Pearson BM, Hitchin E, Mulholland F, van Diemen PM, et al. Amino acid-dependent growth of *Campylobacter jejuni*: key roles for aspartase (*AspA*) under microaerobic and oxygen-limited conditions and identification of *AspB* (*Cj0762*), essential for growth on glutamate. *Mol Microbiol*. 2008;69(1):77-93.
27. Hofreuter D, Novik V, Galan JE. Metabolic diversity in *Campylobacter jejuni* enhances specific tissue colonization. *Cell host & microbe*. 2008;4(5):425-33.
28. Leach S, Harvey P, Wali R. Changes with growth rate in the membrane lipid composition of and amino acid utilization by continuous cultures of *Campylobacter jejuni*. *Journal of applied microbiology*. 1997;82(5):631-40.
29. Velayudhan J, Jones MA, Barrow PA, Kelly DJ. L-serine catabolism via an oxygen-labile L-serine dehydratase is essential for colonization of the avian gut by *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun*. 2004;72(1):260-8.

30. Mohammed KA, Miles RJ, Halablab MA. The pattern and kinetics of substrate metabolism of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Letters in applied microbiology. 2004;39(3):261-6.
31. Tate SS, Meister A. gamma-Glutamyl transpeptidase: catalytic, structural and functional aspects. Mol Cell Biochem. 1981;39:357-68.
32. Orlowski M, Meister A. The gamma-glutamyl cycle: a possible transport system for amino acids. Proc Natl Acad Sci U S A. 1970;67(3):1248-55.
33. Stahl M, Butcher J, Stintzi A. Nutrient acquisition and metabolism by *Campylobacter jejuni*. Front Cell Infect Microbiol. 2012;2:5.
34. Chevalier C, Thiberge JM, Ferrero RL, Labigne A. Essential role of *Helicobacter pylori* gamma-glutamyltranspeptidase for the colonization of the gastric mucosa of mice. Mol Microbiol. 1999;31(5):1359-72.
35. McGovern KJ, Blanchard TG, Gutierrez JA, Czinn SJ, Krakowka S, Youngman P. gamma-Glutamyltransferase is a *Helicobacter pylori* virulence factor but is not essential for colonization. Infect Immun. 2001;69(6):4168-73.
36. Takahashi H, Hirose K, Watanabe H. Necessity of meningococcal gamma-glutamyl aminopeptidase for *Neisseria meningitidis* growth in rat cerebrospinal fluid (CSF) and CSF-like medium. J Bacteriol. 2004;186(1):244-7.
37. Thompson SA, Gaynor EC. *Campylobacter jejuni* host tissue tropism: a consequence of its low-carb lifestyle? Cell Host Microbe. 2008;4(5):409-10.
38. Line JE, Hiett KL, Guard-Bouldin J, Seal BS. Differential carbon source utilization by *Campylobacter jejuni* 11168 in response to growth temperature variation. J Microbiol Methods. 2010;80(2):198-202.
39. Gripp E, Hlahla D, Didelot X, Kops F, Maurischat S, Tedin K, et al. Closely related *Campylobacter jejuni* strains from different sources reveal a generalist rather than a specialist lifestyle. BMC Genomics. 2011;12:584.
40. Muraoka WT, Zhang Q. Phenotypic and genotypic evidence for L-fucose utilization by *Campylobacter jejuni*. J Bacteriol. 2011;193(5):1065-75.

41. Stahl M, Friis LM, Nothhaft H, Liu X, Li J, Szymanski CM, et al. L-fucose utilization provides *Campylobacter jejuni* with a competitive advantage. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2011;108(17):7194-9.
42. Eisenreich W, Dandekar T, Heesemann J, Goebel W. Carbon metabolism of intracellular bacterial pathogens and possible links to virulence. Nat Rev Microbiol. 2010;8(6):401-12.
43. Myers JD, Kelly DJ. A sulphite respiration system in the chemoheterotrophic human pathogen *Campylobacter jejuni*. Microbiology (Reading, England). 2005;151(Pt 1):233-42.
44. Sellars MJ, Hall SJ, Kelly DJ. Growth of *Campylobacter jejuni* supported by respiration of fumarate, nitrate, nitrite, trimethylamine-N-oxide, or dimethyl sulfoxide requires oxygen. Journal of bacteriology. 2002;184(15):4187-96.
45. Hofreuter D, Tsai J, Watson RO, Novik V, Altman B, Benitez M, et al. Unique features of a highly pathogenic *Campylobacter jejuni* strain. Infect Immun. 2006;74(8):4694-707.
46. Zautner AE, Herrmann S, Corso J, Tareen AM, Alter T, Gross U. Epidemiological association of different *Campylobacter jejuni* groups with metabolism-associated genetic markers. Appl Environ Microbiol. 2011;77(7):2359-65.
47. Gonzalez M, Hakkinen M, Rautelin H, Hanninen ML. Bovine *Campylobacter jejuni* strains differ from human and chicken strains in an analysis of certain molecular genetic markers. Appl Environ Microbiol. 2009;75(4):1208-10.
48. Allos BM. *Campylobacter jejuni* Infections: update on emerging issues and trends. Clin Infect Dis. 2001;32(8):1201-6.
49. Pitkanen T. Review of *Campylobacter* spp. in drinking and environmental waters. J Microbiol Methods. 2013;95(1):39-47.



50. Golz G, Rosner B, Hofreuter D, Josenhans C, Kreienbrock L, Lowenstein A, et al. Relevance of *Campylobacter* to public health--the need for a One Health approach. *Int J Med Microbiol*. 2014;304(7):817-23.
51. Kaakoush NO, Castano-Rodriguez N, Mitchell HM, Man SM. Global Epidemiology of *Campylobacter* Infection. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28(3):687-720.
52. CDC, Center for Disease Control and Prevention. Principles of Epidemiology in Public Health Practice, Third Edition An Introduction to Applied Epidemiology and Biostatistics. 2006, Course SS1978.
53. Ramonaite S, Tamuleviciene E, Alter T, Kasnauskite N, Malakauskas M. MLST genotypes of *Campylobacter jejuni* isolated from broiler products, dairy cattle and human campylobacteriosis cases in Lithuania. *BMC Infect Dis*. 2017;17(1):430.
54. Kovanen SM, Kivisto RI, Rossi M, Schott T, Karkkainen UM, Tuuminen T, et al. Multilocus sequence typing (MLST) and whole-genome MLST of *Campylobacter jejuni* isolates from human infections in three districts during a seasonal peak in Finland. *J Clin Microbiol*. 2014;52(12):4147-54.
55. Taboada EN, Clark CG, Sproston EL, Carrillo CD. Current methods for molecular typing of *Campylobacter* species. *J Microbiol Methods*. 2013;95(1):24-31.
56. Harris SR, Feil EJ, Holden MT, Quail MA, Nickerson EK, Chantratita N, et al. Evolution of MRSA during hospital transmission and intercontinental spread. *Science*. 2010;327(5964):469-74.
57. Kittl S, Heckel G, Korczak BM, Kuhnert P. Source attribution of human *Campylobacter* isolates by MLST and fla-typing and association of genotypes with quinolone resistance. *PLoS One*. 2013;8(11):e81796.
58. Sheppard SK, Dallas JF, Wilson DJ, Strachan NJ, McCarthy ND, Jolley KA, et al. Evolution of an agriculture-associated disease causing *Campylobacter coli* clade: evidence from national surveillance data in Scotland. *PLoS One*. 2010;5(12):e15708.

59. Meric G, Miragaia M, de Been M, Yahara K, Pascoe B, Mageiros L, et al. Ecological Overlap and Horizontal Gene Transfer in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Genome Biol Evol.* 2015;7(5):1313-28.
60. Meric G, Yahara K, Mageiros L, Pascoe B, Maiden MC, Jolley KA, et al. A reference pan-genome approach to comparative bacterial genomics: identification of novel epidemiological markers in pathogenic *Campylobacter*. *PLoS One.* 2014;9(3):e92798.
61. Yang Z, Rannala B. Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nat Rev Genet.* 2012;13(5):303-14.
62. French N, Barrigas M, Brown P, Ribiero P, Williams N, Leatherbarrow H, et al. Spatial epidemiology and natural population structure of *Campylobacter jejuni* colonizing a farmland ecosystem. *Environ Microbiol.* 2005;7(8):1116-26.
63. Dingle KE, Colles FM, Ure R, Wagenaar JA, Duim B, Bolton FJ, et al. Molecular characterization of *Campylobacter jejuni* clones: a basis for epidemiologic investigation. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(9):949-55.
64. Sheppard SK, Dallas JF, Strachan NJ, MacRae M, McCarthy ND, Wilson DJ, et al. *Campylobacter* genotyping to determine the source of human infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 2009;48(8):1072-8.
65. Wilson DJ, Gabriel E, Leatherbarrow AJ, Cheesbrough J, Gee S, Bolton E, et al. Tracing the source of campylobacteriosis. *PLoS Genet.* 2008;4(9):e1000203.
66. Dingle KE, Colles FM, Wareing DR, Ure R, Fox AJ, Bolton FE, et al. Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol.* 2001;39(1):14-23.
67. Cody AJ, Bray JE, Jolley KA, McCarthy ND, Maiden MCJ. Core genome multilocus sequencet scheme for stable, comparative analyses of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* Human Disease Isolates. *J Clin Microbiol.* 2017;55(7):2086-97.

68. Manning G, Dowson CG, Bagnall MC, Ahmed IH, West M, Newell DG. Multilocus sequence typing for comparison of veterinary and human isolates of *Campylobacter jejuni*. Appl Environ Microbiol. 2003;69(11):6370-9.
69. Lazou T, Houf K, Soultos N, Dovas C, Iossifidou E. *Campylobacter* in small ruminants at slaughter: prevalence, pulsotypes and antibiotic resistance. Int J Food Microbiol. 2014;173:54-61.
70. Amadi VA, Matthew-Belmar V, Subbarao C, Kashoma I, Rajashekara G, Sharma R, et al. *Campylobacter* species isolated from pigs in Grenada exhibited novel clones: genotypes and antimicrobial resistance profiles of sequence types. Foodborne Pathog Dis. 2017.
71. Rapp D, Ross CM, Pleydell EJ, Muirhead RW. Differences in the fecal concentrations and genetic diversities of *Campylobacter jejuni* populations among individual cows in two dairy herds. Appl Environ Microbiol. 2012;78(21):7564-71.
72. Humphrey T, O'Brien S, Madsen M. *Campylobacters* as zoonotic pathogens: a food production perspective. Int J Food Microbiol. 2007;117(3):237-57.
73. Boysen L, Rosenquist H, Larsson JT, Nielsen EM, Sorensen G, Nordentoft S, et al. Source attribution of human campylobacteriosis in Denmark. Epidemiol Infect. 2014;142(8):1599-608.
74. Raji MA, Adekeye JO, Kwaga JK, Bale JO. Bioserogroups of *Campylobacter* species isolated from sheep in Kaduna State, Nigeria. Small Rumin Res. 2000;37(3):215-21.
75. Baker J, Barton MD, Lanser J. *Campylobacter* species in cats and dogs in South Australia. Aust Vet J. 1999;77(10):662-6.
76. Kapperud G, Rosef O. Avian wildlife reservoir of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*, *Yersinia* spp., and *Salmonella* spp. in Norway. Appl Environ Microbiol. 1983;45(2):375-80.

- 
77. Marin C, Palomeque MD, Marco-Jimenez F, Vega S. Wild griffon vultures (*Gyps fulvus*) as a source of *Salmonella* and *Campylobacter* in Eastern Spain. *PLoS One*. 2014;9(4):e94191.
78. Pacha RE, Clark GW, Williams EA, Carter AM, Scheffelman JJ, Debusschere P. Small rodents and other mammals associated with mountain meadows as reservoirs of *Giardia* spp. and *Campylobacter* spp. *Appl Environ Microbiol*. 1987;53(7):1574-9.
79. Navarro-Gonzalez N, Ugarte-Ruiz M, Porrero MC, Zamora L, Mentaberre G, Serrano E, et al. *Campylobacter* shared between free-ranging cattle and sympatric wild ungulates in a natural environment (NE Spain). *EcoHealth*. 2014;11(3):333-42.
80. Horrocks SM, Anderson RC, Nisbet DJ, Ricke SC. Incidence and ecology of *Campylobacter jejuni* and *coli* in animals. *Anaerobe*. 2009;15(1-2):18-25.
81. Atanassova V, Reich F, Beckmann L, Klein G. Prevalence of *Campylobacter* spp. in turkey meat from a slaughterhouse and in turkey meat retail products. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2007;49(1):141-5.
82. Bae W, Kaya KN, Hancock DD, Call DR, Park YH, Besser TE. Prevalence and antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter* spp. from cattle farms in Washington state. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005;71(1):169-74.
83. Harvey RB, Hume ME, Droleskey RE, Edrington TS, Sheffield CL, Callaway TR, et al. Further characterization of *Campylobacter* isolated from U.S. dairy cows. *Foodborne pathogens and disease*. 2005;2(2):182-7.
84. Inglis GD, Kalischuk LD. Use of PCR for direct detection of *Campylobacter* species in bovine feces. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003;69(6):3435-47.
85. Thakur S, Gebreyes WA. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* in antimicrobial-free and conventional pig production systems. *Journal of food protection*. 2005;68(11):2402-10.

- 86.** Alter T, Gaull F, Kasimir S, Gurtler M, Mielke H, Linnebur M, et al. Prevalences and transmission routes of *Campylobacter* spp. strains within multiple pig farms. *Veterinary microbiology*. 2005;108(3-4):251-61.
- 87.** Wesley IV, Wells SJ, Harmon KM, Green A, Schroeder-Tucker L, Glover M, et al. Fecal shedding of *Campylobacter* and *Arcobacter* spp. in dairy cattle. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000;66(5):1994-2000.
- 88.** Guyard-Nicodème M, Rivoal K, Houard E, Rose V, Quesne S, Mourand G, et al. Prevalence and characterization of *Campylobacter jejuni* from chicken meat sold in French retail outlets. *International journal of food microbiology*. 2015;203:8-14.
- 89.** Korsak D, Mackiw E, Rozynek E, Zylowska M. Prevalence of *Campylobacter* spp. in retail chicken, turkey, pork, and beef meat in Poland between 2009 and 2013. *Journal of food protection*. 2015;78(5):1024-8.
- 90.** Ozbey G, Tasdemir B. Seasonality and antibiotic resistance of *Campylobacter* in turkish chicken meat. *Veterinaria Italiana*. 2014;50(4):277-83.
- 91.** Verhoeff-Bakkenes L, Jansen HA, in 't Veld PH, Beumer RR, Zwietering MH, van Leusden FM. Consumption of raw vegetables and fruits: a risk factor for *Campylobacter* infections. *Int J Food Microbiol*. 2011;144(3):406-12.
- 92.** Verhoeff-Bakkenes L, Beumer RR, de Jonge R, van Leusden FM, de Jong AE. Quantification of *Campylobacter jejuni* cross-contamination via hands, cutlery, and cutting board during preparation of a chicken fruit salad. *J Food Prot*. 2008;71(5):1018-22.
- 93.** Khalid MI, Tang JY, Baharuddin NH, Rahman NS, Rahimi NF, Radu S. Prevalence, antibiogram, and *cdt* genes of toxigenic *Campylobacter jejuni* in salad style vegetables (ulam) at farms and retail outlets in Terengganu. *J Food Prot*. 2015;78(1):65-71.
- 94.** Guevremont E, Lamoureux L, Genereux M, Cote C. Irrigation water sources and time intervals as variables on the presence of *Campylobacter* spp. and *Listeria monocytogenes* on Romaine Lettuce Grown in Muck Soil. *J Food Prot*. 2017;80(7):1182-7.

- 
95. Painter JA, Hoekstra RM, Ayers T, Tauxe RV, Braden CR, Angulo FJ, et al. Attribution of foodborne illnesses, hospitalizations, and deaths to food commodities by using outbreak data, United States, 1998-2008. *Emerging infectious diseases*. 2013;19(3):407-15.
96. Galanis E, Mak S, Otterstatter M, Taylor M, Zubel M, Takaro TK, et al. The association between campylobacteriosis, agriculture and drinking water: a case-case study in a region of British Columbia, Canada, 2005-2009. *Epidemiol Infect*. 2014;142(10):2075-84.
97. Whiley H, van den Akker B, Giglio S, Bentham R. The role of environmental reservoirs in human campylobacteriosis. *Int J Environ Res Public Health*. 2013;10(11):5886-907.
98. Said B, Wright F, Nichols GL, Reacher M, Rutter M. Outbreaks of infectious disease associated with private drinking water supplies in England and Wales 1970-2000. *Epidemiol Infect*. 2003;130(3):469-79.
99. Nichols GL. Fly transmission of *Campylobacter*. *Emerg Infect Dis*. 2005;11(3):361-4.
100. Coker AO, Isokpehi RD, Thomas BN, Amisu KO, Obi CL. Human campylobacteriosis in developing countries. *Emerg Infect Dis*. 2002;8(3):237-44.
101. Black RE, Levine MM, Clements ML, Hughes TP, Blaser MJ. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *J Infect Dis*. 1988;157(3):472-9.
102. Man SM. The clinical importance of emerging *Campylobacter* species. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011;8(12):669-85.
103. Peterson MC. Clinical aspects of *Campylobacter jejuni* infections in adults. *West J Med*. 1994;161(2):148-52.
104. Blaser MJ, Hoverson D, Ely IG, Duncan DJ, Wang WL, Brown WR. Studies of *Campylobacter jejuni* in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1984;86(1):33-8.

- 105.** Verdu EF, Mauro M, Bourgeois J, Armstrong D. Clinical onset of celiac disease after an episode of *Campylobacter jejuni* enteritis. *Can J Gastroenterol*. 2007;21(7):453-5.
- 106.** Gerritsen van der Hoop A, Veringa EM. Cholecystitis caused by *Campylobacter jejuni*. *Clin Infect Dis*. 1993;17(1):133.
- 107.** Baker MG, Kvalsvig A, Zhang J, Lake R, Sears A, Wilson N. Declining Guillain-Barre syndrome after campylobacteriosis control, New Zealand, 1988-2010. *Emerg Infect Dis*. 2012;18(2):226-33.
- 108.** Koga M, Gilbert M, Li J, Koike S, Takahashi M, Furukawa K, et al. Antecedent infections in Fisher syndrome: a common pathogenesis of molecular mimicry. *Neurology*. 2005;64(9):1605-11.
- 109.** Obafemi MT, Douglas H. *Campylobacter jejuni* myocarditis: A journey from the gut to the heart. *SAGE Open Med Case Rep*. 2017;5:2050313X17713148.
- 110.** Thomas K, Chan KN, Ribeiro CD. *Campylobacter jejuni/coli* meningitis in a neonate. *Br Med J*. 1980;280(6227):1301-2.
- 111.** Pope JE, Krizova A, Garg AX, Thiessen-Philbrook H, Ouimet JM. *Campylobacter* reactive arthritis: a systematic review. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2007;37(1):48-55.
- 112.** Simor AE, Karmali MA, Jadavji T, Roscoe M. Abortion and perinatal sepsis associated with *Campylobacter* infection. *Rev Infect Dis*. 1986;8(3):397-402.
- 113.** Luangtongkum T, Jeon B, Han J, Plummer P, Logue CM, Zhang Q. Antibiotic resistance in *Campylobacter*: emergence, transmission and persistence. *Future microbiology*. 2009;4(2):189-200.
- 114.** Martinez JL. The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 2009;276(1667):2521-30.
- 115.** Sengupta S, Chattopadhyay MK, Grossart HP. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Front Microbiol*. 2013;4:47.

- 116.** Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. 1929. Bull World Health Organ. 2001;79(8):780-90.
- 117.** Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. J Clin Invest. 2003;111(9):1265-73.
- 118.** Aminov RI. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. Front Microbiol. 2010;1:134.
- 119.** Quesada A, Ugarte-Ruiz M, Iglesias MR, Porrero MC, Martinez R, Florez-Cuadrado D, et al. Detection of plasmid mediated colistin resistance (MCR-1) in *Escherichia coli* and *Salmonella* enterica isolated from poultry and swine in Spain. Res Vet Sci. 2016;105:134-5.
- 120.** Gulland A. WHO targets antimicrobial resistance in new essential medicines list. BMJ. 2017;357:j2809.
- 121.** EFSA, EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2017. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2015. EFSA Journal. 2017;15(2):212.
- 122.** Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. Microbiol Spectr. 2016;4(2).
- 123.** Blair JM, Richmond GE, Piddock LJ. Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. Future Microbiol. 2014;9(10):1165-77.
- 124.** Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. Drug Resist Updat. 2010;13(6):151-71.
- 125.** Woodford N, Ellington MJ. The emergence of antibiotic resistance by mutation. Clin Microbiol Infect. 2007;13(1):5-18.
- 126.** von Wintersdorff CJ, Penders J, van Niekerk JM, Mills ND, Majumder S, van Alphen LB, et al. Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. Front Microbiol. 2016;7:173.



- 127.** Qin S, Wang Y, Zhang Q, Zhang M, Deng F, Shen Z, et al. Report of ribosomal RNA methylase gene *erm*(B) in multidrug-resistant *Campylobacter coli*. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2014;69(4):964-8.
- 128.** Kurland CG, Canback B, Berg OG. Horizontal gene transfer: a critical view. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(17):9658-62.
- 129.** Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. Lancet Infect Dis. 2006;6(10):629-40.
- 130.** Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA, Collins JJ. A Common Mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. Cell. 2007;130(5):797-810.
- 131.** Andriole VT. The quinolones: past, present, and future. Clin Infect Dis. 2005;41 Suppl 2:S113-9.
- 132.** Emmerson AM, Jones AM. The quinolones: decades of development and use. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2003;51 Suppl 1:13-20.
- 133.** Mitscher LA. Bacterial topoisomerase inhibitors: quinolone and pyridone antibacterial agents. Chem Rev. 2005;105(2):559-92.
- 134.** Payot S, Bolla JM, Corcoran D, Fanning S, Megraud F, Zhang Q. Mechanisms of fluoroquinolone and macrolide resistance in *Campylobacter* spp. Microbes Infect. 2006;8(7):1967-71.
- 135.** Lin J, Michel LO, Zhang Q. CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46(7):2124-31.
- 136.** EFSA, EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2016. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014. EFSA Journal, 2016;14(2):4380.
- 137.** van Hoek AH, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Roberts AP, Aarts HJ. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. Front Microbiol. 2011;2:203.

- 138.** Nelson ML, Levy SB. The history of the tetracyclines. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1241:17-32.
- 139.** Li W, Atkinson GC, Thakor NS, Allas U, Lu CC, Chan KY, et al. Mechanism of tetracycline resistance by ribosomal protection protein *Tet(O)*. *Nat Commun.* 2013;4:1477.
- 140.** Lee CY, Tai CL, Lin SC, Chen YT. Occurrence of plasmids and tetracycline resistance among *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from whole market chickens and clinical samples. *Int J Food Microbiol.* 1994;24(1-2):161-70.
- 141.** Gibreel A, Tracz DM, Nonaka L, Ngo TM, Connell SR, Taylor DE. Incidence of antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* isolated in Alberta, Canada, from 1999 to 2002, with special reference to *tet(O)*-mediated tetracycline resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(9):3442-50.
- 142.** Pratt A, Korolik V. Tetracycline resistance of Australian *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 2005;55(4):452-60.
- 143.** Gibreel A, Wetsch NM, Taylor DE. Contribution of the CmeABC efflux pump to macrolide and tetracycline resistance in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(9):3212-6.
- 144.** Mankin AS. Macrolide myths. *Curr Opin Microbiol.* 2008;11(5):414-21.
- 145.** Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis.* 2002;34(4):482-92.
- 146.** Vacher S, Menard A, Bernard E, Santos A, Megraud F. Detection of mutations associated with macrolide resistance in thermophilic *Campylobacter* spp. by real-time PCR. *Microb Drug Resist.* 2005;11(1):40-7.
- 147.** Ohno H, Wachino J, Saito R, Jin W, Yamada K, Kimura K, et al. A Highly macrolide-resistant *Campylobacter jejuni* strain with rare A2074T mutations in 23S rRNA genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(4):2580-1.

- 148.** Jensen LB, Aarestrup FM. Macrolide resistance in *Campylobacter coli* of animal origin in Denmark. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(1):371-2.
- 149.** Maravic G. Macrolide resistance based on the Erm-mediated rRNA methylation. *Curr Drug Targets Infect Disord.* 2004;4(3):193-202.
- 150.** Wang Y, Zhang M, Deng F, Shen Z, Wu C, Zhang J, et al. Emergence of multidrug-resistant *Campylobacter* species isolates with a horizontally acquired rRNA methylase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(9):5405-12.
- 151.** Florez-Cuadrado D, Ugarte-Ruiz M, Quesada A, Palomo G, Dominguez L, Porrero MC. Description of an *erm(B)*-carrying *Campylobacter coli* isolate in Europe. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 2016;71(3):841-3.
- 152.** Perez-Boto D, Lopez-Portoles JA, Simon C, Valdezate S, Echeita MA. Study of the molecular mechanisms involved in high-level macrolide resistance of Spanish *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 2010;65(10):2083-8.
- 153.** Cagliero C, Mouline C, Payot S, Cloeckaert A. Involvement of the CmeABC efflux pump in the macrolide resistance of *Campylobacter coli*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 2005;56(5):948-50.
- 154.** Cagliero C, Mouline C, Cloeckaert A, Payot S. Synergy between efflux pump CmeABC and modifications in ribosomal proteins L4 and L22 in conferring macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(11):3893-6.
- 155.** Schatz A, Bugie E, Waksman SA. Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. 1944. *Clin Orthop Relat Res.* 2005(437):3-6.
- 156.** Eliopoulos GM. Synergism and antagonism. *Infect Dis Clin North Am.* 1989;3(3):399-406.
- 157.** Hermann T. Aminoglycoside antibiotics: old drugs and new therapeutic approaches. *Cell Mol Life Sci.* 2007;64(14):1841-52.

- 158.** Llano-Sotelo B, Azucena EF, Jr., Kotra LP, Mobashery S, Chow CS. Aminoglycosides modified by resistance enzymes display diminished binding to the bacterial ribosomal aminoacyl-tRNA site. *Chem Biol*. 2002;9(4):455-63.
- 159.** Trieu-Cuot P, Gerbaud G, Lambert T, Courvalin P. In vivo transfer of genetic information between gram-positive and gram-negative bacteria. *EMBO J*. 1985;4(13A):3583-7.
- 160.** Olkkola S, Culebro A, Juntunen P, Hanninen ML, Rossi M. Functional genomics in *Campylobacter coli* identified a novel streptomycin resistance gene located in a hypervariable genomic region. *Microbiology*. 2016;162(7):1157-66.
- 161.** WHO, World Health Organization. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. 2017. WHO Department of Communications.
- 162.** Tenover FC, Elvrum PM. Detection of two different kanamycin resistance genes in naturally occurring isolates of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1988;32(8):1170-3.
- 163.** Tenover FC, Gilbert T, O'Hara P. Nucleotide sequence of a novel kanamycin resistance gene, *aphA-7*, from *Campylobacter jejuni* and comparison to other kanamycin phosphotransferase genes. *Plasmid*. 1989;22(1):52-8.
- 164.** Pinto-Alphandary H, Mabilat C, Courvalin P. Emergence of aminoglycoside resistance genes *aadA* and *aadE* in the genus *Campylobacter*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990;34(6):1294-6.
- 165.** Jacob J, Evers S, Bischoff K, Carlier C, Courvalin P. Characterization of the *sat4* gene encoding a streptothricin acetyltransferase in *Campylobacter coli* BE/G4. *FEMS Microbiol Lett*. 1994;120(1-2):13-7.
- 166.** Gibreel A, Skold O, Taylor DE. Characterization of plasmid-mediated *aphA-3* kanamycin resistance in *Campylobacter jejuni*. *Microb Drug Resist*. 2004;10(2):98-105.
- 167.** Nirdnoy W, Mason CJ, Guerry P. Mosaic structure of a multiple-drug-resistant, conjugative plasmid from *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(6):2454-9.

- 168.** Lee MD, Sanchez S, Zimmer M, Idris U, Berrang ME, McDermott PF. Class 1 integron-associated tobramycin-gentamicin resistance in *Campylobacter jejuni* isolated from the broiler chicken house environment. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(11):3660-4.
- 169.** Toth M, Frase H, Antunes NT, Vakulenko SB. Novel aminoglycoside 2"-phosphotransferase identified in a gram-negative pathogen. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(1):452-7.
- 170.** Zhao S, Mukherjee S, Chen Y, Li C, Young S, Warren M, et al. Novel gentamicin resistance genes in *Campylobacter* isolated from humans and retail meats in the USA. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 2015;70(5):1314-21.
- 171.** Qin S, Wang Y, Zhang Q, Chen X, Shen Z, Deng F, et al. Identification of a novel genomic island conferring resistance to multiple aminoglycoside antibiotics in *Campylobacter coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(10):5332-9.
- 172.** Deng F, Wang Y, Zhang Y, Shen Z. Characterization of the genetic environment of the ribosomal RNA methylase gene *erm(B)* in *Campylobacter jejuni*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 2015;70(2):613-5.
- 173.** Lambert T, Gerbaud G, Trieu-Cuot P, Courvalin P. Structural relationship between the genes encoding 3'-aminoglycoside phosphotransferases in *Campylobacter* and in gram-positive cocci. *Ann Inst Pasteur Microbiol* (1985). 1985;136B(2):135-50.
- 174.** Courvalin P. Transfer of antibiotic resistance genes between gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994;38(7):1447-51.
- 175.** Lee MD, Newell DG. *Campylobacter* in poultry: filling an ecological niche. *Avian diseases.* 2006;50(1):1-9.
- 176.** Hepworth PJ, Ashelford KE, Hinds J, Gould KA, Witney AA, Williams NJ, et al. Genomic variations define divergence of water/wildlife-associated *Campylobacter jejuni* niche specialists from common clonal complexes. *Environ Microbiol.* 2011;13(6):1549-60.

- 
- 177.** Strachan NJ, Forbes KJ. The growing UK epidemic of human campylobacteriosis. *Lancet* (London, England). 2010;376(9742):665-7.
- 178.** Llaena AK, Huneau A, Hakkinen M, Hanninen ML. Predominant *Campylobacter jejuni* sequence types persist in Finnish chicken production. *PloS one*. 2015;10(2):e0116585.
- 179.** Habib I, Miller WG, Uyttendaele M, Houf K, De Zutter L. Clonal population structure and antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* in chicken meat from Belgium. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75(13):4264-72.
- 180.** Moran AP. The role of endotoxin in infection: *Helicobacter pylori* and *Campylobacter jejuni*. *Sub-cellular biochemistry*. 2010;53:209-40.
- 181.** Gong M, Ling SS, Lui SY, Yeoh KG, Ho B. *Helicobacter pylori* gamma-glutamyl transpeptidase is a pathogenic factor in the development of peptic ulcer disease. *Gastroenterology*. 2010;139(2):564-73.
- 182.** Aykroyd WR. FAO and nutrition. *Proc Nutr Soc*. 1956;15(1):4-13.
- 183.** EFSA, EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2015. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013. *EFSA Journal*, 2015;13(2):4036.
- 184.** EFSA, EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2013. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2011. *EFSA Journal*, 2013;11(5):3196.
- 185.** Wieczorek K, Osek J. Antimicrobial resistance mechanisms among *Campylobacter*. *Biomed Res Int*. 2013;2013:340605.
- 186.** Domingues AR, Pires SM, Halasa T, Hald T. Source attribution of human campylobacteriosis using a meta-analysis of case-control studies of sporadic infections. *Epidemiol Infect*. 2012;140(6):970-81.
- 187.** Frost JA. Current epidemiological issues in human campylobacteriosis. *Symp Ser Soc Appl Microbiol*. 2001(30):85S-95S.

- 188.** Habib I, Uyttendaele M, De Zutter L. Survival of poultry-derived *Campylobacter jejuni* of multilocus sequence type clonal complexes 21 and 45 under freeze, chill, oxidative, acid and heat stresses. *Food microbiology*. 2010;27(6):829-34.
- 189.** Oporto B, Juste RA, Lopez-Portoles JA, Hurtado A. Genetic diversity among *Campylobacter jejuni* isolates from healthy livestock and their links to human isolates in Spain. *Zoonoses Public Health*. 2011;58(5):365-75.
- 190.** Dearlove BL, Cody AJ, Pascoe B, Meric G, Wilson DJ, Sheppard SK. Rapid host switching in generalist *Campylobacter* strains erodes the signal for tracing human infections. *The ISME journal*. 2016;10(3):721-9.
- 191.** Sproston EL, Ogden ID, MacRae M, Dallas JF, Sheppard SK, Cody AJ, et al. Temporal variation and host association in the *Campylobacter* population in a longitudinal ruminant farm study. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(18):6579-86.
- 192.** Rodriguez-Martinez S, Cervero-Arago S, Gil-Martin I, Araujo R. Multilocus sequence typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains isolated from environmental waters in the Mediterranean area. *Environmental research*. 2013;127:56-62.
- 193.** Cody AJ, McCarthy ND, Bray JE, Wimalarathna HM, Colles FM, Jansen van Rensburg MJ, et al. Wild bird-associated *Campylobacter jejuni* isolates are a consistent source of human disease, in Oxfordshire, United Kingdom. *Environ Microbiol Rep*. 2015;7(5):782-8.
- 194.** Zhang M, Gu Y, He L, Ran L, Xia S, Han X, et al. Molecular typing and antimicrobial susceptibility profiles of *Campylobacter jejuni* isolates from north China. *J Med Microbiol*. 2010;59(Pt 10):1171-7.
- 195.** Di Giannatale E, Garofolo G, Alessiani A, Di Donato G, Candeloro L, Vencia W, et al. Tracing Back Clinical *Campylobacter jejuni* in the Northwest of Italy and Assessing Their Potential Source. *Front Microbiol*. 2016;7:887.
- 196.** Ma H, Su Y, Ma L, Ma L, Li P, Du X, et al. Prevalence and characterization of *Campylobacter jejuni* Isolated from retail chicken in Tianjin, China. *Journal of food protection*. 2017;80(6):1032-40.

- 197.** Nguyen TN, Hotzel H, El-Adawy H, Tran HT, Le MT, Tomaso H, et al. Genotyping and antibiotic resistance of thermophilic *Campylobacter* isolated from chicken and pig meat in Vietnam. *Gut pathogens*. 2016;8:19.
- 198.** Piccirillo A, Giacomelli M, Salata C, Bettanello S, De Canale E, Palu G. Multilocus sequence typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from humans and chickens in North-Eastern Italy. *New Microbiol*. 2014;37(4):557-62.
- 199.** Mikulic M, Humski A, Njari B, Ostovic M, Duvnjak S, Cvetnic Z. Prevalence of thermotolerant *Campylobacter* spp. in chicken meat in Croatia and multilocus sequence typing of a small subset of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates. *Food Technol Biotechnol*. 2016;54(4):475-81.
- 200.** Levesque S, Frost E, Arbeit RD, Michaud S. Multilocus sequence typing of *Campylobacter jejuni* isolates from humans, chickens, raw milk, and environmental water in Quebec, Canada. *J Clin Microbiol*. 2008;46(10):3404-11.
- 201.** Cody AJ, McCarthy NM, Wimalarathna HL, Colles FM, Clark L, Bowler IC, et al. A longitudinal 6-year study of the molecular epidemiology of clinical *Campylobacter* isolates in Oxfordshire, United kingdom. *Journal of clinical microbiology*. 2012;50(10):3193-201.
- 202.** Wang X, Zhao S, Harbottle H, Tran T, Blickenstaff K, Abbott J, et al. Antimicrobial resistance and molecular subtyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from retail meats. *J Food Prot*. 2011;74(4):616-21.
- 203.** Sheppard SK, Maiden MC. The evolution of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7(8):a018119.
- 204.** Sheppard SK, Didelot X, Jolley KA, Darling AE, Pascoe B, Meric G, et al. Progressive genome-wide introgression in agricultural *Campylobacter coli*. *Mol Ecol*. 2013;22(4):1051-64.
- 205.** Hofreuter D. Defining the metabolic requirements for the growth and colonization capacity of *Campylobacter jejuni*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2014;4:137.



- 206.** de Haan CP, Llaena AK, Revez J, Hanninen ML. Association of *Campylobacter jejuni* metabolic traits with multilocus sequence types. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(16):5550-4.
- 207.** Engberg J, Aarestrup FM, Taylor DE, Gerner-Smidt P, Nachamkin I. Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates. *Emerg Infect Dis.* 2001;7(1):24-34.
- 208.** Schaad UB. Fluoroquinolone antibiotics in infants and children. *Infect Dis Clin North Am.* 2005;19(3):617-28.
- 209.** Cabal A, Porrero MC, ML DLC, Saez JL, Barcena C, Lopez G, et al. Molecular characterization and antimicrobial resistance of STEC strains isolated from healthy cattle in 2011 and 2013 in Spain. *Epidemiology and infection.* 2016;144(14):2956-66.
- 210.** Phillips I, Casewell M, Cox T, De Groot B, Friis C, Jones R, et al. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2004;53(1):28-52.
- 211.** Gibreel A, Kos VN, Keelan M, Trieber CA, Levesque S, Michaud S, et al. Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*: molecular mechanism and stability of the resistance phenotype. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(7):2753-9.
- 212.** Goodchild C, Dove B, Riley D, Morris AJ. Antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* species. *N Z Med J.* 2001;114(1145):560-1.
- 213.** Corcoran D, Quinn T, Cotter L, Fanning S. An investigation of the molecular mechanisms contributing to high-level erythromycin resistance in *Campylobacter*. *Int J Antimicrob Agents.* 2006;27(1):40-5.
- 214.** Mamelli L, Prouzet-Mauleon V, Pages JM, Megraud F, Bolla JM. Molecular basis of macrolide resistance in *Campylobacter*: role of efflux pumps and target mutations. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 2005;56(3):491-7.
- 215.** Payot S, Avrain L, Magras C, Praud K, Cloeckaert A, Chaslus-Dancla E. Relative contribution of target gene mutation and efflux to fluoroquinolone and

erythromycin resistance, in French poultry and pig isolates of *Campylobacter coli*. Int J Antimicrob Agents. 2004;23(5):468-72.

**216.** Aarestrup FM. Transmission of antibiotic resistance from food animals to humans. In: Nachamkin I, Szymanski CM, Blaser MJ, editors. *Campylobacter*. 3. ASM Press; Washington DC, USA: 2008. pp 645-665.

**217.** Caldwell DB, Wang Y, Lin J. Development, stability, and molecular mechanisms of macrolide resistance in *Campylobacter jejuni*. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52(11):3947-54.

**218.** Lin J, Yan M, Sahin O, Pereira S, Chang YJ, Zhang Q. Effect of macrolide usage on emergence of erythromycin-resistant *Campylobacter* isolates in chickens. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51(5):1678-86.

**219.** Wang Y, Zhang M, Deng F, Shen Z, Wu C, Zhang J, et al. Emergence of multidrug-resistant *Campylobacter* species isolates with a horizontally acquired rRNA methylase. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(9):5405-12.

**220.** Hegde NV, Kariyawasam S, DebRoy C. Comparison of antimicrobial resistant genes in chicken gut microbiome grown on organic and conventional diet. Veterinary and Animal Science. 2016;1:9-14.

**221.** Zilhao R, Papadopoulou B, Courvalin P. Occurrence of the *Campylobacter* resistance gene *tetO* in *Enterococcus* and *Streptococcus* spp. Antimicrob Agents Chemother. 1988;32(12):1793-6.

**222.** Arthur M, Andremont A, Courvalin P. Distribution of erythromycin esterase and rRNA methylase genes in members of the family *Enterobacteriaceae* highly resistant to erythromycin. Antimicrob Agents Chemother. 1987;31(3):404-9.

**223.** Brisson-Noel A, Arthur M, Courvalin P. Evidence for natural gene transfer from gram-positive cocci to *Escherichia coli*. J Bacteriol. 1988;170(4):1739-45.

**224.** Queipo-Ortuno MI, Boto-Ordóñez M, Murri M, Gomez-Zumaquero JM, Clemente-Postigo M, Estruch R, et al. Influence of red wine polyphenols and ethanol on the gut microbiota ecology and biochemical biomarkers. Am J Clin Nutr. 2012;95(6):1323-34.

- 225.** Palmieri C, Varaldo PE, Facinelli B. *Streptococcus suis*, an emerging Drug-resistant animal and human pathogen. *Front Microbiol.* 2011;2:235.
- 226.** Huang J, Ma J, Shang K, Hu X, Liang Y, Li D, et al. Evolution and diversity of the antimicrobial resistance associated mobilome in *Streptococcus suis*: A probable mobile genetic elements reservoir for other *Streptococci*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2016;6:118.
- 227.** Palmieri C, Magi G, Mingoia M, Bagnarelli P, Ripa S, Varaldo PE, et al. Characterization of a *Streptococcus suis* *tet*(O/W/32/O)-carrying element transferable to major streptococcal pathogens. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(9):4697-702.
- 228.** Zhu YG, Johnson TA, Su JQ, Qiao M, Guo GX, Stedtfeld RD, et al. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(9):3435-40.
- 229.** Huddleston JR. Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes. *Infect Drug Resist.* 2014;7:167-76.
- 230.** EMA, European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP), 2010. Reflection paper on the use of macrolides, lincosamides and streptogramins (MLS) in food-producing animals in the European Union: development of resistance and impact on human and animal health. EMA(CVMP/SAGAM/741087/2009).
- 231.** Baquero F, Martinez JL, Canton R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr Opin Biotechnol.* 2008;19(3):260-5.
- 232.** Ugarte-Ruiz M, Florez-Cuadrado D, Wassenaar TM, Porrero MC, Dominguez L. Method comparison for enhanced recovery, isolation and qualitative detection of *C. jejuni* and *C. coli* from wastewater effluent samples. *Int J Environ Res Public Health.* 2015;12(3):2749-64.
- 233.** Tajada P, Gomez-Graces JL, Alos JI, Balas D, Cogollos R. Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* to 12 beta-lactam

agents and combinations with beta-lactamase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40(8):1924-5.

**234.** Sykes RB, Matthew M. The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to beta-lactam antibiotics. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 1976;2(2):115-57.

**235.** Connell SR, Trieber CA, Dinos GP, Einfeldt E, Taylor DE, Nierhaus KH. Mechanism of *Tet*(O)-mediated tetracycline resistance. *EMBO J.* 2003;22(4):945-53.

**236.** Taylor DE, Courvalin P. Mechanisms of antibiotic resistance in *Campylobacter* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 1988;32(8):1107-12.

**237.** Avrain L, Vernozzy-Rozand C, Kempf I. Evidence for natural horizontal transfer of *tetO* gene between *Campylobacter jejuni* strains in chickens. *J Appl Microbiol.* 2004;97(1):134-40.

**238.** Lehtopolku M, Nakari UM, Kotilainen P, Huovinen P, Siitonen A, Hakanen AJ. Antimicrobial susceptibilities of multidrug-resistant *Campylobacter jejuni* and *C. coli* strains: in vitro activities of 20 antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(3):1232-6.

**239.** Chen Y, Mukherjee S, Hoffmann M, Kotewicz ML, Young S, Abbott J, et al. Whole-genome sequencing of gentamicin-resistant *Campylobacter coli* isolated from U.S. retail meats reveals novel plasmid-mediated aminoglycoside resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(11):5398-405.

**240.** Yao H, Liu D, Wang Y, Zhang Q, Shen Z. High Prevalence and Predominance of the *aph*(2'')-I<sub>f</sub> gene conferring aminoglycoside resistance in *Campylobacter*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(5).

**241.** Gardner SP, Olson JW. Barriers to Horizontal gene transfer in *Campylobacter jejuni*. *Adv Appl Microbiol.* 2012;79:19-42.

**242.** Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol.* 2014;32(4):347-55.

- 243.** Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics*. 2007;8:172.
- 244.** Pearson BM, Louwen R, van Baarlen P, van Vliet AH. Differential Distribution of type II CRISPR-Cas systems in agricultural and nonagricultural *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* Isolates correlates with lack of shared environments. *Genome Biol Evol*. 2015;7(9):2663-79.
- 245.** Chapman JS. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. *Int Biodeterior Biodegradation*. 2003;51(4):6.
- 246.** Werner G, Hildebrandt B, Witte W. Linkage of *erm*(B) and *aadE-sat4-aphA-3* in multiple-resistant *Enterococcus faecium* isolates of different ecological origins. *Microb Drug Resist*. 2003;9 Suppl 1:S9-16.
- 247.** Abril C, Brodard I, Perreten V. Two novel antibiotic resistance genes, *tet*(44) and *ant*(6)-Ib, are located within a transferable pathogenicity island in *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(7):3052-5.
- 248.** Toussaint A, Merlin C. Mobile elements as a combination of functional modules. *Plasmid*. 2002;47(1):26-35.
- 249.** Leplae R, Lima-Mendez G, Toussaint A. A first global analysis of plasmid encoded proteins in the ACLAME database. *FEMS Microbiol Rev*. 2006;30(6):980-94.
- 250.** Hanssen AM, Kjeldsen G, Sollid JU. Local variants of *Staphylococcal* cassette chromosome *mec* in sporadic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococci*: evidence of horizontal gene transfer? *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(1):285-96.
- 251.** Sheppard SK, McCarthy ND, Falush D, Maiden MC. Convergence of *Campylobacter* species: implications for bacterial evolution. *Science*. 2008;320(5873):237-9.

- 252.** Lupo A, Coyne S, Berendonk TU. Origin and evolution of antibiotic resistance: the common mechanisms of emergence and spread in water bodies. *Front Microbiol.* 2012;3:18.
- 253.** Proia L, von Schiller D, Sanchez-Melsio A, Sabater S, Borrego CM, Rodriguez-Mozaz S, et al. Occurrence and persistence of antibiotic resistance genes in river biofilms after wastewater inputs in small rivers. *Environ Pollut.* 2016;210:121-8.
- 254.** Munck C, Albertsen M, Telke A, Ellabaan M, Nielsen PH, Sommer MO. Limited dissemination of the wastewater treatment plant core resistome. *Nat Commun.* 2015;6:8452.
- 255.** Ferreira da Silva M, Tiago I, Verissimo A, Boaventura RA, Nunes OC, Manaia CM. Antibiotic resistance of enterococci and related bacteria in an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol Ecol.* 2006;55(2):322-9.
- 256.** Figueira V, Vaz-Moreira I, Silva M, Manaia CM. Diversity and antibiotic resistance of *Aeromonas* spp. in drinking and waste water treatment plants. *Water Res.* 2011;45(17):5599-611.



## 11. ANEXOS





### 11.1 Abreviaturas

**AAC:** Aminoglucósido acetiltransferasa.

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.

**ANT:** Aminoglucósido nucleotidil transferasa.

**APH:** Aminoglucósido fosfotransferasa.

**BIGSdb:** Base de datos de Secuencias Genómicas de Aislados Bacterianos (*Bacterial Isolate Genome Sequence Database*).

**CC:** Complejo clonal.

**CMI:** Concentración mínima inhibitoria.

**ECDC:** Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (*European Centre for Diseases Prevention and Control*).

**EFSA:** Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (*European Food Safety Authority*).

**MET:** Microscopio electrónico de transmisión.

**MLSB:** Macrólidos, lincosamidas y estreptograminas de tipo B.

**MLST:** Tipificación multilocus de secuencias (*Multilocus Sequence Typing*).

**NCBI:** Centro Nacional para la Información Biotecnológica (*National Centre for Biotechnology Information*).

**OMS:** Organización Mundial de la Salud.

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*).

**PFGE:** Electroforesis de campo pulsado (*Pulsed-field Gel Electrophoresis*).

**SNP:** Polimorfismo de nucleótido único (*Single Nucleotide Polimorfism*).

**ST:** Secuencia tipo.

**SVR:** Región corta variable (Short Variable Region) del gen *flaA*.

**UE:** Unión Europea.

**UFC:** Unidad formadora de colonia.

## 11.2 Lista de genes

***aacA/aphD***: Genes que codifican un enzima bifuncional que participa en la resistencia a gentamicina, tobramicina y kanamicina. La resistencia a la tobramicina y la kanamicina se debe a la actividad de aminoglucósido acetiltransferasa (ACC), especificada por la región N-terminal. La región C-terminal es una quinasa que fosforila varios aminoglucósidos.

***ansB***: Gen que codifica el enzima L-Asparaginasa que cataliza la conversión de asparagina en aspartato. Algunos aislados de *Campylobacter* poseen este enzima con una secuencia señal que le hace insertarse en el periplasma (*ansB<sup>s</sup>*).

***ant-like***: Gen que codifica un enzima capaz de producir resistencia a estreptomycin en *C. coli* y comparte alrededor del 30% de aminoácidos con los enzimas nucleotidil transferasas de resistencia a aminoglucósidos (ANT) descritas previamente en este género bacteriano.

***ant(3)* o *aadA***: Gen que codifica los enzimas de tipo ANT más comúnmente encontradas, y que ofrecen resistencia a la espectinomicina y estreptomycin. La nomenclatura alternativa para la proteína codificada por este gen es ANT(3 "-)la ó AAD(3").

***ant(6)* ó *aadE***: Gen que codifica un enzima de resistencia a la estreptomycin. Es un gen muy extendido entre bacterias grampositivas y suele encontrarse asociado al triplete *ant(6)-sat4-aph(3)* que ofrece resistencia a aminoglucósidos y estreptomycin.

***ant(9)* ó *aad9***: Gen que codifica un enzima de resistencia a la espectinomicina.

***aph(2)***: Gen que codifica un enzima de resistencia a gentamicina y está ampliamente distribuido en bacterias grampositivas. Corresponde al tipo de enzimas modificadoras de aminoglucósidos, las cuales son del tipo fosfotransferasas (APH).

***aph(3)-III***: Gen que codifica un enzima de tipo APH que produce resistencia a kanamicina, neomicina, lividomicina, paromomicina, livostamicina, butirosina, amicacina e isepamicina.

***aphA-3***: Gen que codifica un enzima de tipo APH que produce resistencia a kanamicina.

**aphA-7:** Gen que codifica un enzima de tipo APH que produce resistencia a kanamicina.

**aspA:** Gen que codifica el enzima Aspartasa A. Es uno de los siete genes a considerar en el tipado por MLST en *Campylobacter*.

**dmsA:** Gen que codifica el enzima dimetil sulfoxido reductasa. Cataliza la reducción de dimetilsulfóxido (DMSO) a sulfuro de dimetilo (DMS). La DMSO reductasa sirve como reductasa terminal en condiciones anaeróbicas, siendo DMSO el aceptor terminal de electrones.

**erm(B):** Gen que codifica un enzima de resistencia a macrólidos. Este enzima actúa metilando la base 2075 del gen 23S impidiendo que los macrólidos se unan al ribosoma.

**flaA:** Gen que codifica la flagelina. La técnica de tipado de aislados de *Campylobacter* flaA-SVR, está basada en la secuenciación de la región variable de este gen.

**fucP:** Gen que codifica un enzima de tipo permeasa de L-fucosa localizado en la región periplásmica. Permite a la bacteria metabolizar L-fucosa hasta la formación de piruvato.

**ggt:** Gen que codifica el enzima gamma glutamiltranspeptidasa. Es un enzima de tipo transferasa que cataliza la transferencia de grupos funcionales de moléculas tales como glutatión a un aceptor que puede ser un aminoácido, un péptido o agua.

**glnA:** Gen que codifica el enzima glutamina sintasa. Es uno de los siete genes a considerar en el tipado por MLST en *Campylobacter*.

**gltA:** Gen que codifica el enzima citrato sintasa. Es uno de los siete genes a considerar en el tipado por MLST en *Campylobacter*.

**glyA:** Gen que codifica el enzima serina hidroximetil transferasa. Es uno de los siete genes a considerar en el tipado por MLST en *Campylobacter*.

**gyrA:** Gen que codifica el enzima ADN girasa. Mutaciones específicas en este gen producen resistencia a fluoroquinolonas.

**pgm:** Gen que codifica el enzima fosfoglucomutasa. Es uno de los siete genes a considerar en el tipado por MLST en *Campylobacter*.

**sat-4:** Gen que codifica un enzima acetiltransferasa que produce resistencia a estreptotricina.

**tet(O):** Gen que codifica un enzima de resistencia a tetraciclina en *Campylobacter*.

**tkt:** Gen que codifica el enzima transcetolasa implicado en la ruta de las pentosas fosfato. Es uno de los siete genes a considerar en el tipado por MLST en *Campylobacter*.

**uncA:** Gen que codifica la subunidad alfa del enzima ATP sintasa. Es uno de los siete genes a considerar en el tipado por MLST en *Campylobacter*.

### 11.3 Estancias internacionales

- **Milner Centre for Evolution.** Universidad de Bath, Bath, Reino Unido. 2017.  
Supervisor: Profesor Samuel K. Sheppard.  
Duración: 3 meses.
- **Medical School Swansea University,** Swansea, Gales, Reino Unido, 2016.  
Supervisor: Profesor Samuel K. Sheppard.  
Duración: 4 meses.
- **Animal and Plant Health Agency (APHA),** Weybridge, Reino Unido. 2015.  
Supervisor: D<sup>a</sup> Ana Vidal.  
Duración: 6 meses.

#### 11.4 Artículos científicos y de divulgación.

- **Florez-Cuadrado D**, Ugarte-Ruiz M, Quesada A, Palomo G, Dominguez L, Porrero MC. Description of an *erm*(B)-carrying *Campylobacter coli* isolate in Europe. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2016;71(3):841-3. *Publicado*.
- **Florez-Cuadrado D**, Ugarte-Ruiz M, Meric G, Quesada A, Porrero MC, Pascoe B, Sáez-Llorente JL, Lopez Orozco G, Domínguez L, Sheppard SK. Erythromycin resistance in *Campylobacter* from turkey: hosts and paths for horizontal spread of *erm*(B) genes. *Artículo enviado para su publicación a la revista Frontiers in Microbiology en agosto de 2017*.
- **Florez-Cuadrado D**, Ugarte-Ruiz M, Moreno M.A, Dominguez L. Bacterias que no temen a los antibióticos. Profesión Veterinaria. 22(88):6-13, Colegio Oficial de Veterinarios de Madrid. 2017. *Publicado*.

